

Aus dem Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun)

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von Dr. C. Gerspach

**Untersuchung des Lipidoms bei Kühen mit Leberverfettung und bei
gesunden Kühen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
Maude Gubler
Tierärztin
von Wängi/Matzingen TG

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun, Referent
Prof. Dr. H. Nägeli, Korreferent

Zürich, 2012

Aus dem Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun)

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von Dr. C. Gerspach

**Untersuchung des Lipidoms bei Kühen mit Leberverfettung und bei
gesunden Kühen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
Maude Gubler
Tierärztin
von Wängi/Matzingen TG

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun, Referent
Prof. Dr. H. Nägeli, Korreferent

Zürich, 2012

Jakob und meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	5
2. SUMMARY	6
3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	7
4. LITERATURÜBERSICHT	9
4.1. Fettlebersyndrom	9
4.1.1. Epidemiologie	9
4.1.2. Energiestoffwechsel in der peripartalen Übergangsphase	10
4.1.3. Pathogenese	12
4.1.4. Klinik	15
4.1.5. Diagnostik	16
4.2. Metabolomik	22
4.2.1. Lipidomik	23
4.3. Chromatographie	23
4.4. Massenspektrometrie	24
4.4.1. Ionenquellen	25
4.4.2. Analysator	25
5. MATERIAL UND METHODIK	27
5.1. Untersuchte Tiere	27
5.2. Probengewinnung	27
5.2.1. Blut	27
5.2.2. Leberbiopsie	28
5.3. Histologie	28
5.4. Lipidomik	30
5.4.1. Chemikalien	30
5.4.2. Lipidnomenklatur	30
5.4.3. Ermittlung der Extraktionsmethode	30
5.4.4. Messungen der Proben von Milchkühen mit und ohne FLS und mit verschiedenen Schweregraden	34
5.4.5. Datenverarbeitung	36
5.4.6. Identifizierung	36
5.5. Statistik	36
5.6. Zusammenarbeit mit anderen Instituten und Abteilungen der Universität Zürich	38
5.7. Tierversuchsbewilligung	39

6. ERGEBNISSE	40
6.1. Gruppeneinteilung	40
6.2. Extraktionsmethoden	42
6.3. Auswertung des Vergleichs des Lipidoms von HF- und FV-Kühen	45
6.4. Auswertung des Lipidomvergleichs	48
6.4.1. Auswertung des Vergleichs aller Gruppen und der Kühe mit und ohne FLS	48
6.4.2. Auswertung des Vergleichs der Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühen	60
6.4.3. Auswertung des Lipidoms mit der Support Vector Machine (SVM)	65
7. DISKUSSION	67
7.1. Histologie und Gruppeneinteilung	67
7.2. Extraktionsmethoden	69
7.3. Auswertung des Vergleichs des Lipidoms von HF- und FV-Kühen	70
7.4. Auswertung des Lipidomvergleichs	70
7.4.1. Auswertung des Vergleichs aller Gruppen und der Kühe mit und ohne FLS	70
7.4.2. Auswertung des Vergleichs der Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühen	72
7.4.3. Auswertung des Lipidoms mit der Support Vector Machine (SVM)	73
7.5. Mögliche Identifikation der sich signifikant unterscheidenden Massen	74
7.6. Schlussfolgerung	75
8. LITERATURVERZEICHNIS	77
9. LEBENSLAUF	89
10. DANKSAGUNG	88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT	Alanin-Aminotransferase
Apo	Apolipoprotein
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	Body Condition Score
BGA	Between Group Analysis
BHBA	β -Hydroxybutyratsäure
CK	Creatinkinase
ESI	Elektronensprayionisation
FLS	Fettlebersyndrom
FS	Fettsäuren
FV	Fleckvieh
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HF	Holstein Friesian
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IS	Interner Standard
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
MS	Massenspektroskopie
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethyläther
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NEB	Negative Energiebilanz
NEFA	Nicht-veresterte freie Fettsäuren (non-esterified fatty acids)
OCT	Ornithin-Carbamoyltransferase
SAA	Serum-Amyloid-A
SDH	Sorbitdehydrogenase
SVM	Support Vector Machine

TG	Triglyzeride
TOF	Time of Flight
UPLC	Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
VLDL	Very Low-Density Lipoproteins

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Fettlebersyndrom (FLS) ist eine bedeutende metabolische Erkrankung bei Kühen. Sie ist oft mit weiteren Erkrankungen assoziiert. Die definitive Diagnose kann nur invasiv, mit einer Leberbiopsie gestellt werden. Daher wurde in dieser Studie versucht, anhand der Analyse des Lipidoms Unterschiede im Plasma von 63 Kühen mit und ohne FLS und von Kühen mit verschiedenen Schweregraden des FLS zu finden. Die Gruppen wurden nach dem histologischen Schweregrad des FLS in 5 Gruppen (Grad 0 bis Grad 4) eingeteilt.

Die Lipidextraktion aus dem Plasma erfolgte mit *tert*-Butylmethylläther. Der Extrakt wurde anschliessend mittels Chromatographie aufgetrennt und mit einem Massenspektrometer gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass im Lipidom von Tieren mit und ohne FLS und von Tieren mit verschiedenen Schweregraden geringe Unterschiede vorhanden waren. Die Unterschiede waren deutlicher, wenn die Gruppen nur in 3 Schweregrade (leicht, mittel und schwer) eingeteilt wurden. Hier wurde ein potenzieller Biomarker (Masse m/z 468.43458, ein $[M+NH_4]^+$ Ion) gefunden, dessen gemessene Intensitäten tendenziell von der Gruppe der leicht zu der Gruppe der schwer betroffenen Kühe sanken.

In dieser Studie wurden asservierte Proben aus dem Patientengut der letzten 10 Jahre verwendet. Mit diesem Ansatz wurde eine Methode zur Analyse des Lipidoms etabliert. Die Erkenntnisse der vorliegenden Studie dienen als Grundlage für weitere, prospektive Studien mit dem Ziel, einen nicht-invasiven Bluttest zu entwickeln.

2. SUMMARY

The fatty liver syndrome (FLS) is an important metabolic disease in dairy cows in early lactation. The FLS is associated with other metabolic and infectious diseases. The definitive diagnosis can only be made by liver biopsy. In the present study, the analysis of the plasma lipidome was supposed to show differences between the lipidomes of cows with and without FLS. The technique was also applied to distinguish between different degrees of disease. This study should be the basis for further studies to develop a non-invasive blood test to detect FLS.

63 cows were divided in 5 groups, based on histological examination of liver biopsies and the severity of disease (grade 0, healthy, to grade 4, severe FLS).

Lipid extraction from plasma was performed using *tert*-butylmethylether (MTBE). Chromatography was used for separation and mass spectrometry for the analysis of the extracts.

The differences were small between cows with and without FLS and with different degrees.

The differences were more distinct when only three groups (weak, mild, severe FLS) were made. One potential biomarker (mass m/z 468.43458, a $[H+NH_4]^+$ ion) was found whose intensity decreases with severity of the disease.

The samples originated from the last ten years patients of the animal hospital Zurich.

A method for the analysis of the lipidome was established. The findings of this study will be used as basis for further prospective research.

3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Das Fettlebersyndrom (FLS) ist eine metabolische Erkrankung, die vor allem bei Hochleistungskühen zu Beginn der Laktation grosse Bedeutung hat. Sie ist mit weiteren metabolischen und infektiösen Erkrankungen, reduzierter Fruchtbarkeit (KATOH, 2002; BOBE et al., 2004; GEELLEN und WENSING, 2006) und verminderter Milchleistung (VEENHUIZEN et al., 1991) assoziiert. Das FLS entwickelt sich hauptsächlich in der peripartalen Übergangsphase als Folge einer negativen Energiebilanz (NEB) (BOBE et al., 2004). Dies führt zu einer exzessiven Fettmobilisation und dadurch zur Freisetzung von nicht-veresterten freien Fettsäuren (NEFA). Ist die NEFA-Konzentration im Blut über längere Zeit erhöht, kann dies zu einer Akkumulation von Triglyzeriden (TG) in der Leber und somit zu einer Leberverfettung führen (GRUMMER, 1993; DRACKLEY et al., 2001). Die Prävalenz des FLS wird mit bis zu 54 % angegeben (JORRITSMA et al., 2001). Die Mortalitätsraten können bis zu 50 % erreichen, da Kühe mit einem FLS schlecht auf eine Therapie ansprechen (ADEWUYI et al., 2005). Der Verdacht auf ein FLS besteht bei schnellem Gewichtsverlust, Ketonurie, Anorexie, Schwäche und beim Bestehen von peripartalen Erkrankungen (GERLOFF und HERDT, 1999). Veränderungen der Leberenzyme im Blut können zwar einen schweren Leberschaden oder eine eingeschränkte Leberfunktion sowie eine Entzündung reflektieren, diese Befunde sind aber nicht spezifisch für das FLS und können auch bei anderen Erkrankungen auftreten. Für eine definitive Diagnose des FLS müssen eine Leberbiopsie entnommen und der Fettgehalt bestimmt werden (HERDT und GERLOFF, 2008; KALAITZAKIS et al., 2010). Die Entnahme einer Leberbiopsie ist invasiv, verursacht der Kuh ein temporäres Unbehagen und stellt ein geringes Risiko für Infektionen und Blutungen dar. Nach BOBE et al. (2008) und SMITH et al. (1997) sind Leberbiopsien für eine Diagnose auf dem Betrieb nicht praktikabel.

Das FLS wird als Herdenproblem angesehen und beeinträchtigt das Wohlbefinden der Kühe. Es führt zu erhöhten Tierarztkosten, längeren Zwischenkalbezeiten,

verminderter Milchleistung und verkürzter Lebenserwartung und verursacht daher hohe wirtschaftliche Verluste (BOBE et al., 2004; GEELEN und WENSING, 2006).

Das Ziel dieser Studie war es, folgende Fragestellungen zu untersuchen:

1. Gibt es Unterschiede im Lipidom von gesunden und von am FLS erkrankten Kühen?
2. Gibt es Unterschiede im Lipidom von am FLS erkrankten Kühen mit verschiedenen Schweregraden?

Die Fragestellungen basierten auf der Hypothese, dass mit dem FLS eine Veränderung im Muster des Lipidoms oder der Fettsäurevorläufer einhergeht. Diese Veränderungen sollen durch metabolomische Methoden nachgewiesen werden. Die vorliegende Untersuchung dient als Grundlage für weitere Studien mit dem Ziel, einen potenziellen Biomarker zur Diagnose des FLS zu identifizieren und zu validieren.

4. LITERATURÜBERSICHT

4.1. Fettlebersyndrom

Das Fettlebersyndrom (FLS) tritt hauptsächlich bei Hochleistungskühen in der peripartalen Übergangsphase als Folge einer negativen Energiebilanz (NEB) auf und ist eine metabolische Erkrankung (BOBE et al., 2004). Dieser Zustand ist mit weiteren metabolischen und infektiösen Erkrankungen und mit verminderter Fruchtbarkeit assoziiert (BOBE et al., 2004; GEELEN und WENSING, 2006). Das FLS kann anhand des biochemisch oder histologisch bestimmten Triglyzerid- oder Gesamtfettgehalt der Leber, in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt werden. Verschiedene Autoren (GAAL et al. 1983; BOBE et al. 2004) unterteilten die Schweregrade in normal, mild, moderat und schwer, wobei die Einteilungskriterien der Grade je nach Studie variierten. Andere Untersucher (JOHANNSEN et al. 1993) teilten das FLS aufgrund histologischer Kriterien in 5 Gruppen von gesund bis hochgradig ein.

4.1.1. Epidemiologie

BOBE et al. (2004) haben verschiedene Inzidenzstudien zusammengefasst (von Reid, 1980; GERLOFF et al., 1986; JORRITSMA et al., 2001): 5 - 10 % der Kühe haben im ersten Monat nach der Geburt eine hochgradiges und 30 – 40 % ein mittelgradiges FLS, somit haben bis zu 50 % der Milchkühe ein erhöhtes Risiko am FLS zu erkranken (BOBE et al., 2004). Die Inzidenz blieb über die letzten Jahrzehnte trotz der wissenschaftlichen Arbeiten auf diesem Gebiet konstant (MULLIGAN und DOHERTY, 2008). Kühe mit einem FLS sprechen schlecht auf eine Therapie an, wobei Mortalitätsraten bis zu 50 % beobachtet werden (ADEWUYI et al., 2005). Die meisten metabolischen und infektiösen Erkrankungen von Milchkühen treten in der Übergangsphase von Hochträchtigkeit zur Laktation auf. Diese peripartale Übergangsphase wird als die Zeit von 3 Wochen vor bis 3 Wochen nach der Geburt definiert (DRACKLEY, 1999).

4.1.2. Energiestoffwechsel in der peripartalen Übergangsphase

Während der peripartalen Übergangsphase erfahren die Milchkühe eine NEB. Sie nehmen während dieser Phase nicht genügend Futter auf, um den erhöhten Bedarf an Glukose, Aminosäuren (AS) und Fettsäuren (FS) zu decken, der durch die fortschreitende Trächtigkeit und die einsetzende Milchproduktion entsteht. Es kommt somit zu einer abrupten Verschiebung vom anabolen zum katabolen Stoffwechsel (BELL, 1995; HAMMON et al., 2009).

Die Leber ist das wichtigste Organ für die Anpassung an eine NEB. Die Energielieferanten im Körper sind Kohlenhydrate, AS und Fette (HERDT, 2000). Wiederkäuer nehmen über den Gastrointestinaltrakt kaum Kohlenhydrate auf (RUKKWAMSUK et al., 1999b; HERDT, 2000). Die zirkulierende Glukose im Blut stammt hauptsächlich aus der Glukoneogenese in der Leber (RUKKWAMSUK et al., 1999b). Glukose kann aus AS, aber nicht aus Fetten hergestellt werden. Bei einer NEB werden also wichtige Struktur- und Enzymproteine abgebaut, um Glukose herzustellen. Um dies zu verhindern, werden Fettreserven als weitere Energiequelle mobilisiert (HERDT, 2000).

Während Zeiten einer NEB sind FS die Hauptenergiequelle für die meisten Gewebe. Diese FS sind als Triglyzeride (TG) im Fettgewebe gespeichert (VERNON, 2005). Die Mobilisation von Fettspeichern erfolgt durch den Abbau von TG's im Fettgewebe, wodurch nicht-veresterte freie Fettsäuren (NEFA) und Glyzerol entstehen. Die massive Mobilisation von NEFA ist typisch für die peripartale Übergangsphase und ist ein Indikator für eine NEB (BELL, 1995; HERDT und GERLOFF, 2008).

Zur Anpassung an eine NEB gehören die Unterdrückung der Lipogenese, die Steigerung der Lipolyse im Fettgewebe, die Glukoneogenese in der Leber und der verminderte Gebrauch von Glukose im peripheren Gewebe (BELL, 1995; DRACKLEY et al., 2001). Bereits vor der Geburt werden FS aus dem Fettgewebe mobilisiert (GERLOFF et al., 1986). Durch die Lipolyse freigesetzte NEFA werden im Blut an Albumin gebunden transportiert und von der Leber und anderen

Gewebe aufgenommen. Die Aufnahme in die Leber wird durch die NEFA-Konzentration im Blut und dem Blutfluss in der Leber reguliert (EMERY et al., 1992; HERDT und GERLOFF, 2008). Das Schicksal der NEFA in der Leber ist entweder die β -Oxidation zu CO_2 und ATP, die Ketogenese oder die Veresterung zu TG (GRUFFAT et al., 1996). TG werden in der Leber entweder gespeichert oder als Very Low-Density Lipoproteins (VLDL) sezerniert (HERDT, 2000; VAN DEN TOP et al., 2005).

Die Aufteilung der NEFA in der Leber in die Stoffwechselwege β -Oxidation und TG-Synthese ist ein Schlüsselfaktor in der Anpassung der Kuh an eine NEB (HERDT, 2000): Die β -Oxidation von NEFA und anderen Stoffen stellt ATP für die Glukoneogenese zur Verfügung (BELL, 1995) und ist ein wichtiger Mechanismus, um überschüssige Fettsäuren (FS) aus der Leber zu entfernen (EMERY et al., 1992). Die β -Oxidation ist nach der Geburt gesteigert (GRUM et al., 1996). Die Sekretionsrate von TG in VLDL ist bei Wiederkäuern viel kleiner als bei anderen Spezies (PULLEN et al., 1990). VLDL werden in der Leber synthetisiert und sind die Hauptträger von TG (BROWN et al., 1981; KATOH, 2002). Das Hauptprotein der VLDL ist das Apolipoprotein B100 (Apo B100) (GRUFFAT et al., 1996). Da die Synthese und der Export von VLDL in den Hepatozyten energie- und ressourcenabhängig sind, kann jede Störung im Angebot der Ausgangssubstanzen oder von ATP zu einer Hemmung der Lipoproteinsynthese oder -sekretion führen. Bleibt dann die Aufnahme von NEFA in die Leber bestehen, können TG im Zytoplasma akkumulieren (MAXIE und JUBB, 2007). Unter normalen physiologischen Bedingungen beginnt die Leber bereits einige Wochen ante partum TG zu akkumulieren und erreicht den Höhepunkt ca. 1 Woche post partum mit einem Fettgehalt von bis zu 20 % (auf Feuchtgewichtsbasis). Post partum sinkt der TG-Gehalt wieder auf weniger als 5 % (RADOSTITS et al., 2006).

Die Konzentrationen der VLDL und somit auch der TG im Blut sind post partum und somit in einer Phase einer NEB vermindert (VAN DEN TOP et al., 1996;

WENSING et al., 1997). Nach einer solchen Phase, wie z. B. nach einer Fastenperiode oder der peripartalen Übergangszeit, steigt die Konzentration der TG in VLDL in der Lebervene. Dies deutet darauf hin, dass die Sekretion von TG aus der Leber gesteigert wird, um dessen Gehalt in der Leber abzubauen (OIKAWA et al., 2010). Was wiederum darauf hinweist, dass die Veränderungen an der Leber normalerweise funktionell und reversibel sind und dass sich die Kühe an die NEB und die Laktation anpassen (GRUM et al., 1996; HERDT, 2000).

Nebst den Anpassungen in der Leber treten auch hormonelle Veränderungen auf. Das Haupthormon in der Regulation des Energiemetabolismus ist Insulin (HERDT, 2000). Dadurch, dass während der Späträchtigkeit eine Insulinresistenz entsteht, wird die Mobilisation von NEFA und AS sowie das Einsparen von Glukose gefördert (PETTERSON et al., 1993; BELL, 1995).

Das Hormon Glukagon ist der Gegenregulierer von Insulin. Es stimuliert die Lipolyse im Fettgewebe, die Glukoneogenese und die Oxidation von FS in der Leber (BROCKMAN et al., 1975; HERDT, 2000).

4.1.3. Pathogenese

Reichen die oben erwähnten physiologischen Anpassungen nicht aus, kommt es zum FLS (GRUM et al., 1996; HERDT, 2000): Es entsteht, wenn in der Leber die TG-Syntheserate die Rate der NEFA-Oxidation, der TG-Hydrolyse und deren Sekretion als VLDL übersteigt. Die Folge ist eine Akkumulation von TG in der Leber (GRUMMER, 1993; BELL, 1995), wodurch die Funktion der Leberzellen durch die Fettinfiltration beeinträchtigt wird (GRUMMER, 1993; VERNON, 2005). Dies zeigt sich unter anderem darin, dass die Kapazität der β -Oxidation negativ mit dem TG-Gehalt in der Leber, mit der NEFA-Konzentration im Plasma und mit der Milchleistung korreliert. Ob dies jedoch die Folge oder die Ursache der erhöhten TG-Konzentration in der Leber ist, ist nicht bekannt (GRUM et al., 2002). Weiter gibt es Hinweise dafür, dass die VLDL-Sekretion bei Kühen mit erhöhtem Fettgehalt in der Leber und die Kapazität der Glukoneogenese in der

Leber bei Kühen mit FLS reduziert sind (GRUMMER, 1993; RUKKWAMSUK et al., 1999b; KUHLA et al., 2009).

Diese Faktoren führen somit zur Senkung der Blutglukosekonzentration. Dies wiederum verschlimmert die NEB und verstärkt die NEFA-Mobilisation (HERDT, 2000).

Folgen der Leberverfettung

Eine erhöhte FS-Aufnahme der Leber führt zu einer verminderten Futteraufnahme (EMERY et al., 1992). Gleichzeitig ist die Harnstoffsynthese bei Kühen mit FLS reduziert, was zu einer Erhöhung der Konzentration an Ammoniak (NH_3) im Blut führt (STRANG et al., 1998; ZHU et al., 2000). Eine erhöhte Ammoniakkonzentration hemmt die Glukoneogenese aus Propionat und hat zudem einen nachteiligen Effekt auf die Reproduktion, das Immunsystem und das ZNS (STRANG et al., 1998; DRACKLEY, 1999; OVERTON et al., 1999).

Eine hohe NEFA-Konzentration im Blut wird von einem beeinträchtigten Immunsystem begleitet, was die Kühe anfällig für Infektionen macht (RUKKWAMSUK et al., 1999a). Verschiedene Aspekte des Immunsystems werden bei Kühen mit FLS unterdrückt (BOBE et al., 2004). Dazu gehören eine verminderte Zahl der Leukozyten (REID et al., 1984) sowie eine verminderte Fähigkeit, auf ein Entzündungsgeschehen zu reagieren (BOBE et al., 2004; WENSING et al., 1997; ZERBE et al., 2000). Weitere Erkrankungen führen zusätzlich zu einer verminderten Futteraufnahme (RUKKWAMSUK et al., 1999a).

Kühe mit FLS haben eine verminderte Fruchtbarkeit (BOBE et al., 2004), weil eine NEB und somit auch ein erhöhter TG-Gehalt in der Leber mit einem verlängerten Intervall von der Geburt bis zur ersten Ovulation und einer verminderten Konzeptionsrate assoziiert werden (RUKKWAMSUK et al., 1999a; RUKK-WAMSUK et al., 1999d). Eine verminderte Konzentration von IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) und Insulin aber auch eine erhöhte Konzentration

von Ammoniak, NEFA und Harnstoff beeinträchtigen die normale Ovarfunktion (YUNG et al., 1996; JORRITSMA et al., 2003; BOBE et al., 2004).

Die oben genannten Veränderungen führen zu einem Teufelskreis. Die NEFA in der Leber mindern den Appetit und steigern die TG-Synthese. Die Fähigkeiten der β -Oxidation und der TG-Sekretion werden reduziert und es werden mehr TG in der Leber gespeichert. Die Glukoneogenese und Harnstoffsynthese werden vermindert. Durch die erhöhte Ammoniakkonzentration wird die Glukoneogenese noch mehr gehemmt. Die tiefe Glukoneogeneserate und der verminderte Appetit führen wiederum zu einer noch tieferen NEB.

Risikofaktoren

BOBE et al. (2004) teilen die Risikofaktoren in 3 Gruppen ein: Fütterung, Management und Genetik.

Fütterung:

Verfettete Kühe ($BCS \geq 4$) zeigen nach der Geburt eine verlängerte und verstärkte Lipolyse, was zu einer höheren NEFA-Konzentration im Blut führt (RUKKWAMSUK et al., 1998; BOBE et al., 2004). In der peripartalen Übergangsphase nimmt die Futteraufnahme bis zu 30 % ab (BERTICS et al., 1992), wobei bei verfetteten Kühen der Rückgang stärker ausgeprägt ist (GARNSWORTHY und TOPPS, 1982). Infolgedessen ist der Verlust an Körpergewicht post partum bei fetten Kühen grösser als bei restriktiv gefütterten. Deshalb erfahren sie auch eine stärkere NEB (RUKKWAMSUK et al., 1998; RUKKWAMSUK et al., 1999c).

Verschiedene Fütterungsarten ante und post partum können die Entwicklung eines FLS beeinflussen (BOBE et al., 2004).

Kühe mit langer Trockenstehzeit infolge geringer Milchproduktion oder Infertilität sind prädisponiert für eine Verfettung (MORROW, 1976).

Management:

Managementfaktoren, die mit der Fütterung oder dem Gesundheitsstatus zusammenhängen, können die Inzidenz des FLS beeinflussen (GOFF und HORST, 1997; BOBE et al., 2004).

Weitere Managementfaktoren sind ungenügender Platz und/oder ungenügende Bewegung, schlechte Hygiene, hohe Umgebungstemperatur und -feuchtigkeit sowie schlechte Luftzirkulation (GOFF und HORST, 1997; BOBE et al., 2004). Erkrankungen führen zu verminderter Futteraufnahme, erhöhtem Nährstoffbedarf und verursachen entzündliche Reaktionen, welche die Lipolyse im Fettgewebe und damit den Fettgehalt in der Leber erhöhen (DRACKLEY, 1999; BOBE et al., 2004).

Genetik:

Bis jetzt wurden noch keine Heritabilitätswerte für Leber-TG-Gehalt und Leberlipide ermittelt (BOBE et al., 2004).

4.1.4. Klinik

Die klinischen Symptome des FLS sind meist unspezifisch. Anamnestisch sind es Hochleistungskühe, die oft übergewichtig sind und/oder deren BCS (Body Condition Score) in kurzer Zeit gesunken ist. Zudem haben sie meist erst vor Kurzem und nach einer verlängerten Zwischenkalbezeit gekalbt (GERLOFF und HERDT, 1999; JORRITSMA et al., 2001; GEELLEN und WENSING, 2006).

Zu den klinischen Symptomen gehören fast immer Schwäche, Anorexie und Ketose. Weiter können verlängerte Liegeperioden bis Festliegen, verminderte Pansen-tätigkeit, wenig Kot und nervöse Symptome auftreten (GERLOFF und HERDT, 1984; GERLOFF und HERDT, 1999; RADOSTITS et al., 2006; HERDT und GERLOFF, 2008). Häufig leiden diese Kühe zudem unter anderen peripartalen Erkrankungen und sprechen auf die Therapie dieser Erkrankungen nicht oder nur wenig an (GERLOFF und HERDT, 1999; RADOSTITS et al.,

2006). Ohne Therapie werden die Tiere immer schwächer, liegen fest und sterben schliesslich (GERLOFF und HERDT, 1999). Bei Kühen mit mittelgradigem FLS sind die klinischen Zeichen weniger deutlich ausgeprägt und sofern sie fressen, erholen sie sich meistens innert wenigen Tagen (RADOSTITS et al., 2006). Das subklinische FLS ist in vielen Beständen ein Problem und ist mit einem verminderten Gesundheitsstatus, reduzierter Fruchtbarkeit, verringerter Milchleistung und somit mit wirtschaftlichen Verlusten assoziiert (VEENHUIZEN et al., 1991; GERLOFF und HERDT, 1999; BOBE et al., 2004).

4.1.5. Diagnostik

Für eine definitive Diagnose des FLS muss zunächst eine Leberbiopsie entnommen und deren Fettgehalt bestimmt werden (STAUFENBIEL et al., 1993; HERDT und GERLOFF, 2008; KALAITZAKIS et al., 2010). Die Schätzung des Fettgehalts kann histologisch oder biochemisch erfolgen (GAAL et al., 1983; COLLINS et al., 1985).

Biochemisch können die Lipide mit einer Hexan-Isopropanol- (HARA und RADIN, 1978) oder mit einer Chloroform-Wasser-Methanol-Lösung (ATKINSON et al., 1972) aus der Leber extrahiert und anschliessend gemessen werden. Der TG-Gehalt der Leber wird mit Chromatographie, Festphasenextraktion (BATEMAN und JENKINS, 1997) oder kommerziellen Testkits (RUKKWAMSUK et al., 2000) bestimmt.

Die Bestimmung des Gesamtfettgehalts in der Leber ist problematisch, da der hohe Basalwert anderer Lipide den Anstieg der TG-Konzentration in der Leber maskieren kann. Dieser ist jedoch charakteristisch für das FLS (BRUMBY et al., 1975; GAAL et al., 1983). In einer neueren Studie wurde jedoch gezeigt, dass der TG-Gehalt auch aus dem Gesamtfettgehalt berechnet werden kann (STARKE et al., 2010).

Der Fettgehalt in der Leber korreliert mit dem spezifischen Gewicht der Leber. Somit kann der Fettgehalt auch bestimmt werden, in dem man eine Schwimm-

probe der Leber in Wasser und in Kupfersulfatlösungen mit verschiedenen spezifischen Gewichten durchführt (HERDT et al., 1983a; RADOSTITS et al., 2006).

Histologisch kann der Fettgehalt durch stereologische Methoden bestimmt werden, wobei der Anteil der Fetttropfen am Volumen der Hepatozyten bewertet wird (COLLINS und REID, 1980; GAAL et al., 1983). Es besteht eine schwache Korrelation zwischen Klinik und histologischer Verfettung der Leber (KALAITZAKIS et al., 2007).

Nebst dem TG-Gehalt in der Leber können anhand von Leberbiopsien viele andere, im Zusammenhang mit dem FLS relevante Werte bestimmt werden (Tab. 1). Zum Einen sinkt normalerweise der Glykogengehalt in der Leber bei allen Kühen nach der Geburt. Bei Kühen mit FLS ist das Absinken jedoch stärker als bei gesunden Kühen (SMITH et al., 1997; RUKKWAMSUK et al., 1999b). Zum Anderen führt eine intensive Lipolyse zu einer gesteigerter Konzentration von Palmitinsäure ($C_{16:0}$), Ölsäure ($C_{18:1}$), Stearinsäure ($C_{18:0}$) und Linolsäure ($C_{18:2}$) im Blut und infolgedessen auch in der Leber. Eine Ausnahme bildet der Gehalt an Stearinsäure in der Leber, der konstant bleiben oder sinken kann (RUKKWAMSUK et al., 2000; SATO et al., 2004).

Durch verschiedene Analysen können unzählige Enzyme in der Leber von Kühen mit FLS gemessen werden, welche die Stoffwechselwege in der Leber beeinflussen (Tab. 1).

Die Entnahme einer Leberbiopsie ist invasiv, verursacht der Kuh dadurch ein temporäres Unbehagen und stellt ein Risiko dar für Infektionen und Blutungen, die auch letal sein können, wenn ein grosses Gefäss getroffen wird. Daher werden Leberbiopsien als unpraktikabel für eine Diagnose auf dem Betrieb beschrieben (SMITH et al., 1997; BOBE et al., 2008). Die Risiken sind heutzutage wahrscheinlich kleiner, da fast jeder praktizierende Tierarzt ein portables Ultraschallgerät besitzt und mit diesem eine kontrolliertere Entnahme einer Leberbiopsie möglich ist.

Tab. 1: Parameter in der Leber die bei FLS verändert sein können

Parameter	Veränderung	Referenz
TG	↑	RUKKWAMSUK et al., 2000; KALAITZAKIS et al., 2007
Gesamtlipide	↑	GRUFFAT et al., 1997; KALAITZAKIS et al., 2007
Glykogen	↓	VEENHUIZEN et al., 1991; RUKKWAMSUK et al., 1999b
Phospholipide	↓	BRUMBY et al., 1975; GEELEN und WENSING, 2006
Cholesterol	↓	BRUMBY et al., 1975
Palmitin-, Öl-, Linolsäure	↑	RUKKWAMSUK et al., 2000; SATO et al., 2004
Stearinsäure	= oder ↓	RUKKWAMSUK et al., 2000; SATO et al., 2004
Enzyme für die β -Oxidation	↓	VERNON, 2005; KUHLA et al., 2009
Enzyme der Glukoneogenese	↓	RUKKWAMSUK et al., 1999b; KUHLA et al., 2009
Enzyme der Glykolyse	↓	KUHLA et al., 2009
Enzyme der TG-Synthese	↑	WENSING et al., 1997; GEELEN und WENSING, 2006

↑ Konzentration/Aktivität ist bei Kühen mit FLS erhöht

↓ Konzentration/Aktivität ist bei Kühen mit FLS vermindert

= Konzentration/Aktivität ist bei Kühen mit FLS unverändert

Verschiedene Autoren beschreiben biochemische Veränderungen im Serum, die bei Kühen mit einem FLS beobachtet wurden (Tab. 2). Diese hängen vom Schweregrad der Erkrankung ab und sind diagnostisch unzuverlässig (ACORDA et al., 1995).

Erhöhte Aktivitäten der Leberenzyme ASAT, GLDH, SDH und γ -GT sowie die erhöhte Konzentrationen der Gallensäuren im Serum korrelieren mit einem fortgeschrittenen Leberschaden (CEBRA et al., 1997).

Tab. 2: Parameter die im Blut/Serum beim FLS verändert sein können

Parameter	Veränderung	Referenz
Leberenzyme		
GLDH	↑	KALAITZAKIS et al., 2010
ASAT	↑	CEBRA et al., 1997; KALAITZAKIS et al., 2007
OCT	↑	KALAITZAKIS et al., 2006; KALAITZAKIS et al., 2007; KALAITZAKIS et al., 2010
SDH	↑	CEBRA et al., 1997; KALAITZAKIS et al., 2007
ALT	↑	KALAITZAKIS et al., 2007
γ-GT	↑	KALAITZAKIS et al., 2007
LCAT	↓	NAKAGAWA et al., 1997
Leberfunktion		
Bilirubin	↑	CEBRA et al., 1997; KALAITZAKIS et al., 2007
Gallensäure	↑	REHAGE et al., 1999 ; KALAITZAKIS et al., 2007
Ammoniak	↑	REHAGE et al., 1999; ZHU et al., 2000
Albumin	↓	GAAL et al., 1983; GRUFFAT et al., 1997
Glukose	↓	CEBRA et al., 1997; KALAITZAKIS et al., 2006
Fettkomponenten		
NEFA	↑	DOUGLAS et al., 2007; KALAITZAKIS et al., 2007
BHBA	↑	BRUMBY et al., 1975; KALAITZAKIS et al., 2007
TAG	↓	VAN DEN TOP et al., 1996
VLDL	↓	WENSING et al., 1997
Cholesterol	↓	BRUMBY et al., 1975; HERDT et al., 1983b)
Phospholipide	↓	BRUMBY et al., 1975; HERDT et al., 1983b
VLDL	↓	WENSING et al., 1997
Palmitinsäure	↑	BRUMBY et al., 1975; RUKKWAMSUK et al., 2000
Ölsäure	↑	BRUMBY et al., 1975; RUKKWAMSUK et al., 2000
Apo B100	↓	MARCOS et al., 1990; KATOH, 2002
Apo A1	↓	MARCOS et al., 1990
Apo C-III	↓	KATOH und NAKAGAWA-UETA, 2001; YAMAMOTO et al., 2001
Akutphasenproteine und Leukozyten		
Haptoglobin	↑	UCHIDA et al., 1993a; NAKAGAWA et al., 1997
SAA	↑	GUZELBEKTES et al., 2010
Leukozyten	↓	REID et al., 1984

↑ Konzentration/Aktivität ist bei Kühen mit FLS erhöht

↓ Konzentration/Aktivität ist bei Kühen mit FLS vermindert

Die ASAT steigt in der Leber proportional zum TG-Gehalt; sie ist jedoch nicht leberspezifisch und auch bei Muskelschäden erhöht. Zudem ist sie bei fast allen Kühen post partum erhöht (GARRY et al., 1994; KALAITZAKIS et al., 2007). Ammoniak (NH_3) und Albumin können als Indikator für die Leberfunktion verwendet werden (HÄUSSINGER, 1990; BERNABUCCI et al., 2004).

Zu den Indikatoren einer NEB gehören eine erhöhte Konzentrationen an NEFA und β -Hydroxybutyratsäure (BHBA): Die NEFA-Konzentration steigt im Serum proportional zum TG-Gehalt in der Leber (KALAITZAKIS et al., 2007). Betrachtet man die prozentualen Anteile der einzelnen FS an der gesamten NEFA-Konzentration, so steigen Palmitin- und Ölsäure an, während Stearin- und Linolsäure absinken (BRUMBY et al., 1975). Die absoluten Konzentrationen der verschiedenen FS steigen zusammen mit der NEFA-Konzentration jedoch an (BRUMBY et al., 1975; RUKKWAMSUK et al., 2000). Ein weiterer Indikator für eine NEB ist eine verminderte Konzentration an Glukose im Blut (ADEWUYI et al., 2005). Die Glukosekonzentration im Serum sinkt mit zunehmendem TG-Gehalt in der Leber, sie fällt jedoch nur bei schwerwiegendem FLS unter den Referenzbereich (CEBRA et al., 1997; KALAITZAKIS et al., 2006).

Die Anteile von freiem Cholesterin und Gesamtcholesterin am Gesamtfettgehalt in Lipoproteinen sinken nach der Geburt. Die Konzentrationen von freiem und von Gesamtcholesterin sind bei Kühen mit einem FLS vor (signifikant) und nach (tendenziell) der Geburt tiefer als bei gesunden Kühen (VAN DEN TOP et al., 2005). Weiter ist die Serum-Konzentration von Phospholipiden bei Kühen mit einem FLS tiefer als bei gesunden Kühen (HERDT et al., 1983b).

Tiefe Leukozytenzahlen werden ausserdem bei Kühen mit FLS mit der erhöhten Inzidenz von postpartalen Erkrankungen in Verbindung gebracht (REID et al., 1984). Die Haupt-Akutphasenproteine beim Rind sind Serum-Amyloid-A (SAA) und Haptoglobin (ECKERSALL und BELL, 2010). Beide Parameter im Serum sind stark mit einem erhöhten Fettanteil in der Leber assoziiert (GUZELBEKTES et al., 2010). Zu Bemerken ist, dass eine erhöhte Haptoglobinkonzentration auch

allgemein bei Kühen während der Geburt gefunden wurde (UCHIDA et al., 1993a; UCHIDA et al., 1993b).

Die Serumkonzentrationen von Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), Apo B100, Apo A1 und Apo C-III sind bei Kühen mit FLS vermindert. Die gleichen Veränderungen wurden jedoch auch bei anderen mit FLS assoziierten Erkrankungen beschrieben (MARCOS et al., 1990; NAKAGAWA et al., 1997; KATOH und NAKAGAWA-UETA, 2001; KATOH, 2002). LCAT, Apo B100 und Apo A1 stellen folglich nützliche Marker für eine frühe Diagnose von Lebererkrankungen dar (KATOH, 2002).

Die OCT ist ein Indikator für Lebererkrankungen beim Rind und ist bei Tieren mit mittel- bis hochgradigem FLS erhöht (TSUCHIYA et al., 1994; KALAITZAKIS et al., 2006). OCT, ASAT und Bilirubin können verwendet werden, um zwischen einem leichtgradigen und einem hochgradigen FLS zu unterscheiden. Mit diesen Werten kann der Kliniker die Prognose besser einschätzen und eine passende Therapie einleiten (KALAITZAKIS et al., 2007).

Insgesamt können die aufgeführten Parameter auf einen schweren Leberschaden und/oder eine eingeschränkte Leberfunktion, eine Entzündung oder eine NEB hinweisen.

Ein weiteres, nicht invasives, Mittel zur Diagnose von Lebererkrankungen ist die Untersuchung mittels Ultraschall (BRAUN, 2009). Die digitale Analyse der B-Mode-Sonographie der Leber kann potentiell verwendet werden, um den Schweregrad der TG-Infiltration und den TG-Gehalt der Leber zu bestimmen (BOBE et al., 2008; STARKE et al., 2010; THARWAT, 2012). Die Ultraschallgestützte Messung von Lebergrösse und -form kann tendenziell zur Einschätzung des Schweregrades eines FLS verwendet werden. Zur Diagnosestellung ist diese Methode jedoch nur beschränkt einsetzbar, da es grosse interindividuelle Unterschiede zwischen Kühen gibt (HAUDUM et al., 2011).

4.2. Metabolomik

Metabolomik wurde als eine umfassende und quantitative Analyse von allen Metaboliten eines Organismus definiert (FIEHN, 2001). Diese Untersuchung von Organismen auf molekularer Ebene kann in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Genomik, Proteomik, Transkriptomik und Metabolomik (SCHMELZER et al., 2007).

Die Gesamtheit von Metaboliten, die durch ein biologisches System synthetisiert wird, bildet das Metabolom. Das Metabolom kann auf der Ebene von Organismen, Geweben, Zellen und Zellabteilungen definiert werden (FIEHN, 2001).

Die Metabolomik ist also der Endpunkt der „omics“-Kaskade und repräsentiert am ehesten den Phänotypen (SCHMELZER et al., 2007).

Ziel der neuesten Metabolomik-Konzepte ist es, möglichst alle niedermolekularen Verbindungen zu quantifizieren, die in einem biologischen System oder unter bestimmten physiologischen Bedingungen vorhanden sind (GRIFFITHS et al., 2010).

Es existieren die ungezielte und die gezielte Metabolomik. Die ungezielte Metabolomik wird zur globalen Metabolomanalyse verwendet. Das Ziel ist, möglichst viele Analyten zu identifizieren. Der Nachteil der ungezielten Metabolomik-Methode ist die Schwierigkeit, die chemische Identität potentieller Zielanalyten eindeutig aufzuklären (GRIFFITHS et al., 2010). Bei der gezielten Metabolomik-Methode werden zuvor ausgewählte, spezifische Metabolitensignale gemessen und deren relative Intensitäten und absolute Konzentrationen ermittelt. Dies setzt ein Vorwissen über das Metabolom und den chemischen Inhalt der Probe voraus (GRIFFITHS et al., 2010).

„Metabolic Profiling“ wird zur Bestimmung von Biomarkern verwendet, um den pathophysiologischen Zustand von Patienten beurteilen zu können (GRIFFITHS et al., 2010).

4.2.1. Lipidomik

Die Lipidomik kann als eine systemumfassende Charakterisierung von Lipiden und ihren Interaktionen mit anderen biochemischen Stoffen und Zellen definiert werden (CASTRO-PEREZ et al., 2010). Diese Disziplin studiert die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung, die eine Störung des biologischen Systems begleiten mit dem Ziel, die Rolle der Lipide in der Biologie von lebenden Organismen zu verstehen (ASTARITA et al., 2009).

In der Lipidomik wird das Lipidom untersucht. Das Lipidom kann als die umfassende und quantitative Beschreibung einer Kombination von Lipidklassen definiert werden, welche eine Zelle oder einen Bioorganismus ausmachen (CASTRO-PEREZ et al., 2010). Lipide sind biologische Substanzen, welche generell hydrophober Natur sind und sich in den meisten Fällen in organischen Lösungsmitteln lösen (SCHMELZER et al., 2007).

Dadurch, dass Lipide kleinmolekulare Metaboliten sind, ist die Lipidomik ein Teil der Metabolomik (ASTARITA et al., 2009).

4.3. Chromatographie

Bei einem chromatographischen Analyseverfahren werden Stoffgemische durch die unterschiedliche Verteilung der Komponenten in zwei miteinander nicht mischbaren Phasen aufgetrennt und anschliessend mit Detektoren gemessen. Die einzelnen Komponenten der Probe werden durch verschiedene Mechanismen und Eigenschaften getrennt: Molekülgrösse, Löslichkeit, Affinität, Adsorption oder Ionenaustausch. Die Chromatographen funktionieren durch verschiedene Wechselwirkungen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase (KALTENBÖCK, 2010).

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine Art Säulenchromatographie. Die stationäre Phase besteht aus porösem Material in einer Säule. Damit

die Auftrennungsleistung besser wird, besteht bei der HPLC die stationäre Phase aus kleineren Teilchen als bei der normalen Flüssigkeitschromatographie. Je kleiner die Teilchen sind, umso schlechter fließt die flüssige mobile Phase mit dem Probenmaterial durch die stationäre Phase. Daher muss Druck aufgewendet werden, damit die mobile Phase durch die stationäre Phase fließt. Die mobile Phase ist ein Lösungsmittel.

Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (UPLC):

Bei der Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (UPLC) sind die Teilchen der stationären Phase noch kleiner (bis 1.5 μm) und es muss ein umso größerer Druck erzeugt werden, um die mobile Phase durch die stationäre Phase zu bewegen (bis 1000 bar). Mit der UPLC erreicht man eine noch bessere Auftrennung und die Analysezeiten können bis um das 10fache verkürzt werden (KALTENBÖCK, 2010).

4.4. Massenspektrometrie

Ein Massenspektrometer (MS) ist ein Gerät, mit dem aus einer gasförmigen Probe Ionen erzeugt und nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt und registriert werden können. Es ist daher ein Verfahren zum Messen der Masse von Teilchen (BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2004).

Jedes MS besteht nach BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER (2004) im Wesentlichen aus 4 Teilen:

- dem Einlasssystem zur Probeneinführung
- der Ionenquelle, in der die Ionisation erfolgt
- dem Analysator zur Trennung der Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis
- der Einheit zur Registrierung und Ausgabe der Messdaten

4.4.1. Ionenquellen

Es gibt viele verschiedene Ionenquellen. In dieser Studie wurde jedoch nur die Elektronensprayionisation (ESI) verwendet, da sie gut mit Flüssigchromatographen kombiniert werden kann. Daher soll diese Methode hier kurz erklärt werden: Die ESI beruht auf dem Prinzip der Ionenverdampfung. Diese besteht darin, dass Nebeltröpfchen aus der in Lösungsmittel gelösten Probe mit einem Überschuss an positiven und negativen Ladungsträgern erzeugt werden. Dies geschieht, indem am Ende der Sprühkapillare hohe Spannungen angelegt werden, dadurch entsteht ein Flüssigkeitskonus, in welchem sich positive und negative Ionen ansammeln. Aus diesem entstehen schliesslich geladene Tröpfchen. Diese zerfallen, bis nur noch Ionen vorhanden sind oder bis die Ionen aus den Tröpfchen in die Gasphase übergehen (BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2004). Bei der ESI entstehen Ionen meist durch Protonierung $(M+H)^+$ oder Deprotonierung $(M-H)^-$. Es können aber auch Ionen durch Anlagerung von Kationen erzeugt werden. Bei der ESI sind dies vor allem Ammonium (NH_4^+) oder Lithium (Li^+)-Ionen, die sich anlagern (MURPHY et al., 2005).

4.4.2. Analysator

Beschleunigung:

Um ein Massenspektrum zu erhalten, müssen die gebildeten Ionen nach ihren Massen getrennt werden. Hierzu werden sie auf eine bestimmte Geschwindigkeit beschleunigt und zu einem Strahl gebündelt. Dies erreicht man, indem man die Ionen mittels eines schwachen Feldes aus der Ionenquelle entfernt und dann über ein Potenzialgefälle beschleunigt. Die Geschwindigkeit der einzelnen Ionen hängt von der Ladung, der Masse und der Beschleunigungsspannung ab (BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2004).

Time of Flight (TOF) Massenspektrometer:

Die Geschwindigkeit der Ionen ist von ihrer Masse und ihrer Ladung abhängig. Nach dem Passieren der Beschleunigungsstrecke haben alle Ionen die gleiche kinetische Energie. Im nachfolgenden Flugrohr ergeben sich, in Abhängigkeit von der Masse und der Ladung, unterschiedliche Flugzeiten. Leichtere Ionen sind schneller als schwerere. Dies führt zu einer Auftrennung der Ionen nach Masse und Ladung (BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2004; OTTO, 2006).

Quadrupolmassenspektrometer:

Die Ionentrennung erfolgt hier durch Ablenkung mit Hilfe elektrischer Felder. Dieses Gerät besteht aus 4 parallel im Quadrat angeordneten Metallstäben, je 2 sind über Kreuz leitend miteinander verbunden. Über diese Verbindung wird eine Wechselspannung angelegt. Durch sie bauen sich abwechselnd positive und negative Felder relativ zur Mittelachse auf. Die Wechselspannung wird mit einer positiven Gleichspannung überlagert. Durch eine geeignete Abstimmung der Gleich- und Wechselspannung erreicht man, dass jeweils nur Ionen einer bestimmten Masse das Stabsystem durchfliegen (BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2004).

Tandem-Massenspektrometer:

Ein Tandem-MS ist eine Kombination von mehreren Analysatoren. So können im ersten MS Ionen ausgesucht und im zweiten MS deren Zerfall untersucht werden (BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2004).

Weit verbreitet sind Kombinationen mit Quadrupolanalysatoren. So besteht das sogenannte Tripelquadrupol-MS aus drei Einheiten. Auch die Kombination mit Quadrupol- und TOF-Analysatoren ist häufig. Sie bestehen meist aus 2 Quadrupolen und einem TOF (BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2004).

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1. Untersuchte Tiere

Das Probematerial der Kontroll- sowie der erkrankten Kühe stammte aus dem Patientengut des Departements für Nutztiere des Tierspitals Zürich aus den Jahren 2001-2011. Die definitive Diagnose FLS wurde anhand einer histologischen Untersuchung der Leber (Probe aus Leberbiopsie oder Sektion) gestellt. Die Milchkühe waren zwischen 2 und 12 Jahre ($x \pm s = 5.50 \pm 2.31$ Jahre) alt, zwischen 0 und 8 Wochen post partum ($x \pm s = 2.67 \pm 1.87$ Wochen) und gehörten den Rassen Fleckvieh (FV) und Holstein Friesian (HF) an.

Milchkühe mit einem histologisch positiven Befund wurden in die Studie als an FLS erkrankte Kühe aufgenommen. Als Kontrolltiere wurden Milchkühe verwendet, die aufgrund der histologischen Untersuchung der Leber nicht an einem FLS erkrankt und 0 - 8 Wochen post partum waren.

Anhand der histologischen Untersuchung der Leberbiopsie wurden die Tiere (total $n = 63$) in 5 Gruppen eingeteilt (Kriterien siehe Kapitel 5.3.):

Gruppe 0: Grad 0 = Tiere ohne FLS ($n = 14$)

Gruppe 1: Grad 1 = Tiere mit leichtgradigem FLS ($n = 12$)

Gruppe 2: Grad 2 = Tiere mit moderatem FLS ($n = 21$)

Gruppe 3: Grad 3 = Tiere mit mittelgradigem FLS ($n = 11$)

Gruppe 4: Grad 4 = Tiere mit hochgradigem FLS ($n = 5$)

In einem weiteren Ansatz wurden die Gruppen 0 und 1 zur Gruppe der schwach, die Gruppe 2 zur Gruppe der mittel und die Gruppen 3 und 4 zur Gruppe der stark betroffenen Kühe zusammengefasst.

5.2. Probengewinnung

5.2.1. Blut

Es wurden 10 ml Blut aus der V. jugularis entnommen und in ein Lithium-Heparin-Röhrchen gegeben. Das Blut aus den Lithium-Heparin-Röhrchen wurde

zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Das Plasma wurde bei -80 °C aufbewahrt.

5.2.2. Leberbiopsie

Die Entnahme der Biopsie erfolgte nach GERBER (1993) im 10., 11. oder 12. Interkostalraum rechts. Die geeignete Biopsiestelle wurde zunächst mittels Ultraschall identifiziert. Anschliessend wurde die Haut rasiert, gereinigt (Betadine-Seife, Provet AG, Lyssach b. Burgdorf, CH) und desinfiziert (Alkohol und Betadine-Lösung, Provet AG, Lyssach b. Burgdorf, CH). Eine Lokalanästhesie an der Biopsiestelle erfolgte mittels 2 ml Lidocain Hydrochlorid 2 % (Streuli und Co. AG, Uznach CH). Die Inzision der Haut erfolgte mit einer Skalpellklinge Nr. 11. Die Biopsie wurde dann durch eine Biopsienadel (Magnum[®] Reusable Core Biopsy System mit Truguide™ Coaxial needle 14 G x 16 cm von C. R. Bard, Inc., Schweden) und unter Ultraschallkontrolle entnommen. Die Einstichstelle wurde anschliessend mit einem Hautstapler verschlossen und mit Betadine-Lösung desinfiziert. Das Biopstat wurde direkt nach der Entnahme bei Raumtemperatur in 10 %iges Formalin (= 4 %iges Formaldehyd) überführt und für die weitere Verarbeitung in das Labor des Instituts für Veterinärpathologie der Universität Zürich gesandt.

5.3. Histologie

Die Biopstate wurden nach 24-stündiger Fixierung nach einem standardisiertem Protokoll entwässert und in Paraffin eingebettet. Daraus wurden 2 - 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die auf positiv geladene Objektträger aufgezogen und mit Hämalaun-Eosin (HE) angefärbt wurden. Ausgewählte Biopstate wurden, zur Bestimmung des Glykogengehaltes in den Hepatozyten, zusätzlich mit Periodsäure-Schiff Reaktion (PAS) angefärbt. Alle Leberbiopsien wurden von der gleichen Pathologin (Dipl. ECVP) aus dem Institut für Veterinärpathologie der Uni-

versität Zürich, ohne Kenntnis der klinischen Parameter und Diagnose, beurteilt und in 5 Grade eingeteilt.

Die Einteilung erfolgte nach folgenden Kriterien (Abb. 1):

Grad 0: Keine Veränderungen

Grad 1: Nur eine Zone betroffen: z. B. nur zentrolobulär, periportal oder midzonär

Grad 2: Zwei Zonen betroffen: z. B. zentrolobulär bis midzonär

Grad 3: Alle drei Zonen betroffen

Grad 4: Alle drei Zonen hochgradig verfettet inklusive Kupffer'sche Sternzellen

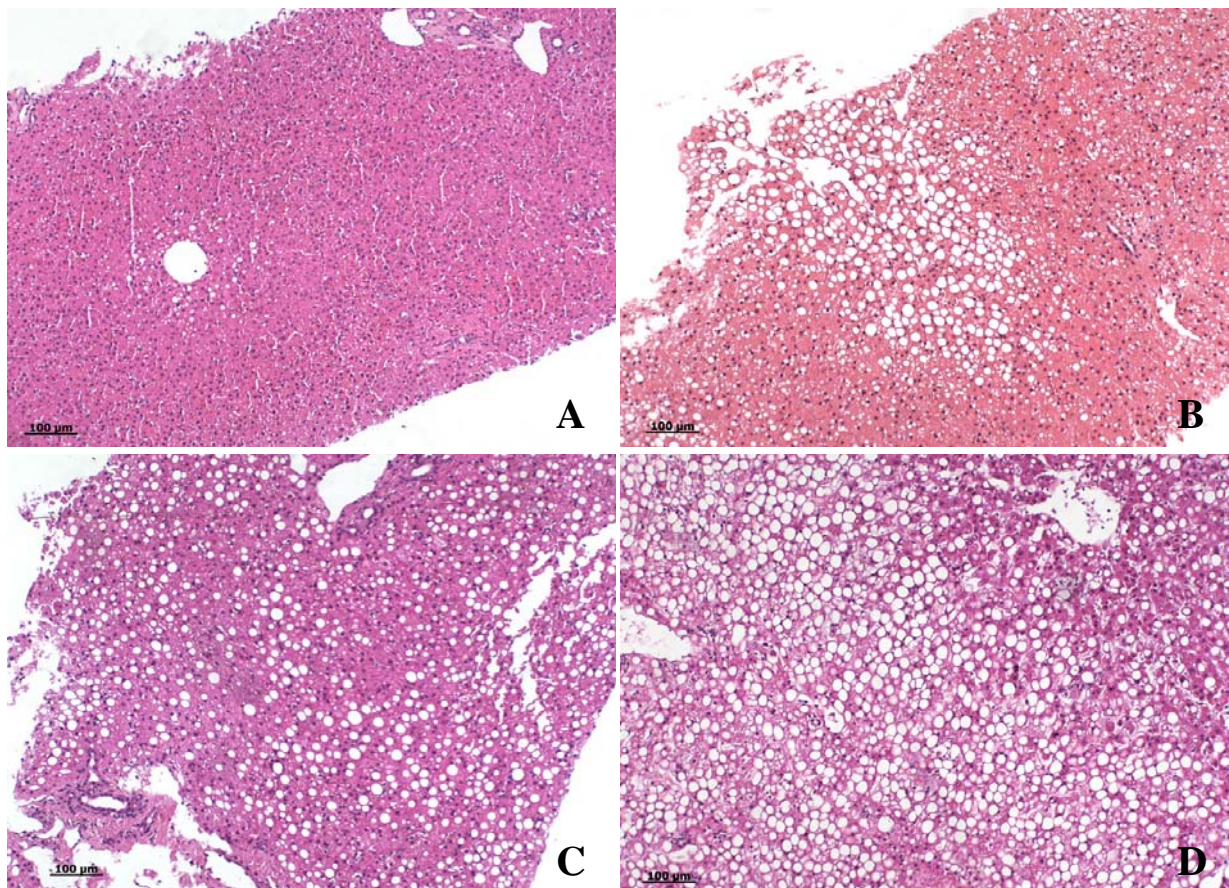


Abb. 1: Histologische Bilder der verschiedenen Gruppen mit HE-Färbung und 10facher Vergrößerung. A: Grad 1, nur die zentrolobuläre Zone ist betroffen; B: Grad 2, die Zonen periportal bis midzonär sind betroffen; C: Grad 3, alle drei Zonen sind betroffen; D: Grad 4, alle drei Zonen sind hochgradig verfettet inklusive Kupffer'sche Sternzellen

5.4. Lipidomik

5.4.1. Chemikalien

Alle Lösungsmittel stammten von Sigma Aldrich, Inc., Buchs SG, CH und waren HPLC-klassifiziert (hochgereinigte Substanzen mit tiefer UV-Absorption).

Als interne Standards (IS) wurden 6 Lipide verwendet:

- 4ME Phosphocholin 16:0/16:0; CAS-Nr. 32448-32-1, Produkt-Nr. 850356 (Avanti[®] Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA) mit einer exakten Masse von 845.687 u
- Phosphocholin 23:0/23:0; CAS-Nr. 112241-60-8, Produkt-Nr. 850372 (Avanti[®] Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA) mit einer exakten Masse von 929.781 u
- Lysophosphocholin 19:0; CAS-Nr. 108273-88-7, Produkt-Nr. 855776 (Avanti[®] Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA) mit einer exakten Masse von 537.379 u
- Phosphocholin 13:0/13:0; CAS-Nr. 71242-28-9, Produkt-Nr. 850340 (Avanti[®] Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA) mit einer exakten Masse von 649.468 u
- Lysophosphocholin 17:0; CAS-Nr. 50930-23-9, Produkt-Nr. 855676 (Avanti[®] Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA) mit einer exakten Masse von 509.348 u
- Palmitinsäure Isotop 1-13C, 99% CAS-Nr. 57677-53-9, Produkt-Nr. CLM-150-1 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA) mit einer exakten Masse von 257.240 u.

5.4.2. Lipidnomenklatur

Es wurde die Lipidnomenklatur von LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>, University of California, La Jolla, CA, USA) nach SCHMELZER et al. (2007) befolgt.

5.4.3. Ermittlung der Extraktionsmethode

Um die geeignetste Methode zur Extraktion von Lipiden aus Plasmaproben zu eruieren, wurden drei verschiedene Vorgehen verglichen: 1. Extraktion nach

BLIGH und DYER (1959), 2. Extraktion nach FOLCH (1957) und 3. Extraktion mit *tert*-Butylmethylether (MTBE) modifiziert nach MATYASH et al. (2008). Das Plasma stammte von einer beliebigen Kuh des Departements für Nutztiere. Als interne Standards (IS) wurden Lysophosphocholin 17:0 und Palmitinsäure Isotop 1-¹³C verwendet. Von jeder Methode wurden je 3 Extraktionen gemacht und gemessen.

- 1) In der Methode von BLIGH und DYER (1959) wurden als erstes 150 µl Chloroform/Methanol (1:2, v/v) mit 40 µl Plasma und 7 µl einer 10 µM Mischung der IS (Endkonzentration im organischen Lösungsmittel ist 350 nM pro IS) mit dem Vortex gemischt. Danach wurden nochmals 50 µl Chloroform zugegeben und nochmals gemischt. Dann wurden 50 µl Wasser (HPLC-klassifiziert, doppelt destilliert) zugegeben, gemischt und bei 100 G während 5 Minuten zentrifugiert.

Diese Extraktionsmethode führte zu einem Zweiphasensystem mit einer oberen wässrigen und einer unteren organischen Phase (lipidhaltiges Extrakt). Zwischen den beiden Phasen befand sich eine voluminöse Schicht aus nicht-extrahierbarer unlöslicher Matrix. In der unteren organischen Phase waren die Lipide gelöst, welche mit einer Pipette gewonnen und weiter verarbeitet wurden.

- 2) In der Methode von FOLCH (1957) wurden 200 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) mit 10 µl Plasma und 1.2 µl einer 10 µM Mischung der IS (Endkonzentration im organischen Lösungsmittel ist 350 nM pro IS) mit dem Vortex gemischt. Danach wurde die Mischung während 20 Minuten bei Raumtemperatur in einem Thermomixer Comfort[®] (Vaudaux-Eppendorf AG, Schönenbuch, Basel, CH) inkubiert und danach bei 400 G während 5 Minuten zentrifugiert. Auch bei dieser Extraktionsmethode handelte es sich um ein Zweiphasensystem mit einer oberen wässrigen und einer unteren organischen Phase (lipidhaltiges Extrakt). Die beiden Phasen wurden durch eine voluminöse Schicht

aus nichtextrahierbarer unlöslicher Matrix getrennt. In der unteren Phase befanden sich die Lipide. Diese Phase wurde abpipettiert und weiter verarbeitet.

- 3) In der Methode mit *tert*-Butylmethylether (MTBE) nach MATYASH et al. (2008) wurden 23 µl einer 10 µM Mischung der IS (Endkonzentration im organischen Lösungsmittel ist 350 nM pro IS) in 127 µl Methanol gelöst, dann 500 µl MTBE und 20 µl Plasma dazugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur im Thermomixer Comfort® (Vaudaux-Eppendorf AG, Schönenbuch, Basel) während einer Stunde inkubiert. Es wurden danach 125 µl Wasser (HPLC-klassifiziert, doppelt destilliert) zugeben und bei 1000 G während 10 Minuten zentrifugiert. Die oberste Phase enthielt das MTBE mit den Lipiden, davon wurden 500 µl abpipettiert und weiter verarbeitet.

Bei allen Methoden wurden die Lösungsmittel bei 30 °C und unter Stickstoff-Zustrom mit dem Techne Dri-Block® DB-3D Sample Concentrator (Bibby Scientific Limited, Beacon Road, Stone, Staffordshire ST15 0SA, UK) verdampft und der Rückstand in 500 µl Methanol (100 %) gelöst. Die Extrakte wurden bei -20 °C bis zur Messung aufbewahrt.

Der Vergleich der Extraktionsmethoden beruhte auf dem Durchschnitt der allgemeinen Messintensitäten im Positiv- und Negativ-ESI-Modus, der Messintensitäten und Messgenauigkeit der IS, der Qualität der Extraktion, der Handhabung sowie auf gesundheitlichen Aspekten.

UPLC-Analyse

Für die Chromatographie und als Einlass für das MS wurde der nanoAcquity™ UPLC (Waters, Milford, MA, USA) verwendet. Die Säulen (0.2 x 100 mm) wurden nach der Dispersions-Methode („Slurry Methode“) mit 1.8 µm grossen C₁₈ HSS T3-Partikel (Waters, Milford, MA, USA) gefüllt.

Für die UPLC wurde ein binäres Gradientensystem mit Lösungsmittel A und B verwendet. Lösungsmittel A bestand aus Acetonitril und Wasser (60:40, v/v) mit 10 mM Ammoniumazetat und Lösungsmittel B aus Acetonitril und Isopropanol (10:90, v/v) mit 10 mM Ammoniumazetat. Zum Aufziehen der Probe wurde als Injektionslösemittel (weak needle wash) das Lösungsmittel A und zur Reinigung der Nadel wurde als Spüllösung der Injektionsnadel (strong needle wash) Isopropanol (100 %) verwendet.

Die Laufzeit betrug 33 Minuten, wobei der Gradient mit 35 % Lösungsmittel B startete und während den ersten 2 Minuten so blieb (Tab. 3). Während 20 Minuten stieg der Anteil an Lösungsmittel B linear auf 95 % und blieb so für weitere 5 Minuten. Innerhalb einer Minute sank der Anteil an Lösungsmittel B wieder auf den Ausgangswert und blieb für weitere 5 Minuten. Der Fluss war während der ganzen Messzeit 4 µl/min.

Das Injektionsvolumen war 1 µl und es wurden Massen im Bereich von 150 bis 1100 Da mit einer Messzeit von 0.5 s erfasst.

Tab. 3: Gradient der Messungen der Extraktionslösungen

Zeit in Min.	Fluss in µl/min	Lösungsmittel A in %	Lösungsmittel B in %
0	4	65	35
2	4	65	35
22	4	5	95
27	4	5	95
28	4	65	35
33	4	65	35

Massenspektrometrie

Das UPLC-System war mit einem Quadrupol-TOF Massenspektrometer (Synapt G2 HDMS, Waters, Milford, MA, USA) gekoppelt. Es wurden positive und negative Elektronensprayionisations-Modi (ESI-Modus) verwendet und je eine Gesamtmessung durchgeführt. Im Positiv-ESI-Modus betrug die kapilläre Spannung 2.50 kV und im Negativ-ESI-Modus 1.60 kV.

Die Massengenauigkeit des Spektrometers wurde durch einen integrierten Standard, der Referenzmasse (dem Lockmass), sichergestellt. Für die Messungen wurde als Referenzmasse Leucin Enkephalin mit der Masse m/z 556.2771 (ein $[M+H]^+$ Ion) verwendet.

5.4.4. Messungen der Proben von Milchkühen mit und ohne FLS und mit verschiedenen Schweregraden

Extraktionsmethode

Zur Extraktion der Lipide aus den Plasmaproben der Milchkühe mit und ohne FLS wurde die Extraktionsmethode mit MTBE modifiziert nach MATYASH et al. (2008) verwendet (siehe Kapitel 5.4.3.). Als IS wurde eine 10 μ M Mischung (Endkonzentration im organischen Lösungsmittel ist 350 nM pro IS) aller in Kapitel 5.4.1. genannter IS eingesetzt.

Davon wurden für den Positiv-ESI-Modus die IS Phosphocholin 23:0/23:0, 4ME Phosphocholin 16:0/16:0, Lysophosphocholin 19:0, Phosphocholin 13:0/13:0 und Lysophosphocholin 17:0 verwendet und für den Negativ-ESI-Modus 4ME Phosphocholin 16:0/16:0 und Palmitinsäure Isotop 1- ^{13}C .

UPLC-Analyse

Die UPLC- und massenspektrometrischen Analysen wurden modifiziert nach CASTRO-PEREZ et al. (2010) durchgeführt.

Für die Chromatographie und als Einlass für das MS wurde der nanoAcquityTM UPLC (Waters, Milford, MA, USA) verwendet.

Der Durchmesser der Säule war 0.2 mm und die Länge 110 mm (siehe Kapitel 5.4.3., UPLC-Analyse). Der durchschnittliche Säulendruck betrug im Positiv-ESI-Modus 5935.54 psi (max. 8549.19 psi) und im Negativ-ESI-Modus 5861.79 psi (max. 7784.67 psi).

Es wurde ein binäres Gradientensystem mit den Lösungsmittel A und B verwendet (siehe Kapitel 5.4.3., UPLC-Analyse).

Zur Qualitätskontrolle wurden immer nach 10 Messungen je ein Durchgang mit reinem Methanol und anschliessend ein Durchgang mit einer reinen IS-Lösung durchgeführt. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden alle Proben zweimal und randomisiert gemessen.

Die Laufzeit betrug 33 Minuten, wobei der Gradient mit 40 % Lösungsmittel B und mit einem Fluss von 2.0 µl/min startete (Tab. 4). Während 18 Minuten stieg der Anteil an Lösungsmittel B linear auf 100 % und blieb so für weitere 10 Minuten. Innerhalb 0.1 Minuten sank der Anteil an Lösungsmittel B wieder auf den Ausgangswert und der Fluss stieg auf 3 µl/min (im Negativ-ESI-Modus auf 2.5 µl/min) und blieb für weitere 5 Minuten erhalten. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl und es wurden Massen im Bereich von 50 bis 1200 Da mit einer Messzeit von 0.3 s erfasst.

Tab. 4: Gradient der Messungen der Plasmaproben der Kühe mit und ohne FLS im Positiv-ESI-Modus

Zeit in Min	Fluss in µl/min	Lösungsmittel A in %	Lösungsmittel B in %
0	2.0	60	40
18	2.0	0	100
28	2.0	0	100
28.1	3.0	60	40
33	3.0	60	40

Massenspektrometrie

Das UPLC-System war mit einem Quadrupol-TOF Massenspektrometer (Synapt G2 HDMS, Waters, Milford, MA, USA) gekoppelt. Es wurden positive und negative ESI-Modi verwendet und je eine Gesamtmessung durchgeführt. Im Positiv-ESI-Modus betrug die kapilläre Spannung 2.50 kV und im Negativ-ESI-Modus 1.80 kV.

Die Massengenauigkeit des Spektrometers wurde durch die Referenzmasse (den Lockmass) sichergestellt (siehe 5.4.3. Massenspektrometrie).

5.4.5. Datenverarbeitung

Die aufgezeichneten massenspektrometrischen Daten (Rohdaten) wurden mit dem Programm MZmine bearbeitet (PLUSKAL et al., 2010; <http://mzmine.sourceforge.net/>; Projekt GNU der Free Software Foundation, Boston, USA) und für die statistische Auswertung mit dem Programm R vorbereitet. Mit Hilfe von MZmine wurden Listen interessierender Massen, einschliesslich zugehöriger Intensitäten, für weiterführende Datenbanksuche und statistische Analyse generiert.

5.4.6. Identifizierung

Um den Massen der potentiellen Biomarker mögliche chemische Identitäten zuteilen, wurde die Datenbank-Suche von MZmine verwendet. Dabei wurde die Datenbank von Lipidmaps (<http://www.lipidmaps.org>, University of California, La Jolla, CA, USA) abgefragt.

5.5. Statistik

Die statistische Auswertung der Lipidomik Daten (MZmine-Listen) wurde mit Hilfe von Dr. Endre Laczko vom Functional Genomics Center Zürich (FGCZ) mit dem „open source“ Programm R (<http://www.r-project.org/>; <http://stat.ethz.ch/CRAN/>; Projekt GNU der Free Software Foundation, Boston, USA) und mit dem Programm GraphPad Prism[®] (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

Die beobachteten Intensitäten der zugesetzten IS zeigten, dass eine Normalisierung (Korrektur für messtechnisch bedingte Intensitätsschwankungen) notwendig war. Dies wurde für die Werte einer gegebenen Probe durch die Normalisierung in Bezug auf den Median der beobachteten Intensitäten für diese Probe erreicht. Im Weiteren wurde bei der Sichtung der Daten eine schiefe (lognormale) Verteilung der Intensitätswerte festgestellt. Um eine angenäherte Normalverteilung der Intensitäten zu erhalten – eine Vorbedingung für die geplante sta-

tistische Auswertung – wurden die Intensitätswerte für die von MZmine gefundenen interessierenden Massen logarithmiert.

Die logarithmierten und normalisierten Intensitätswerte aller interessierender Massen wurden mittels einer univariaten Methode, der 1- und 2-Weg-ANOVA, und mittels zwei multivariaten Methoden, der BGA (Between Group Analysis, eine Variante der linearen Diskriminanzanalyse) und der SVM (Supported Vector Machine, eine Variante der nicht-linearen Diskriminanzanalyse oder Klassifikation) statistisch analysiert. Bei der Analyse mit der SVM wurde eine Trainings- und Testgruppe mit den gemessenen Werten gebildet. Die SVM lernte anhand der Trainingsgruppe die gemessenen Werte der richtigen Klasse (hier der verschiedenen Grade) zuzuordnen und versuchte dann das Gleiche mit den Werten der Testgruppe. Die SVM gab dann anhand der Richtigkeit an, wie viele Werte der Testgruppe den Klassen richtig zugeordnet wurden. Dies wurde wiederholt, bis alle Werte einmal in der Trainings- und der Testgruppe waren.

Für die ANOVA wurde das Programm GraphPad Prism[®] (GraphPad Software) verwendet, für die BGA die Funktionen der R Programm-Bibliothek „made4“ und für die SVM die Funktionen der R Programm-Bibliothek „e1071“. Die Analysen wurden, soweit nicht anders erwähnt, getrennt für die im Positiv-ESI-Modus und Negativ-ESI-Modus bestimmten Lipide berechnet.

Die 1- und 2-Weg-ANOVA und die BGA wurden durchgeführt, um die Unterschiede zwischen folgenden Probengruppen zu untersuchen:

- zwischen den Rassen FV und HF
- zwischen den Tieren mit und ohne FLS beider Rassen zusammen
- zwischen den einzelnen Schweregraden beider Rassen zusammen
- zwischen den Tieren mit und ohne FLS der Rassen FV und HF getrennt
- zwischen den einzelnen Schweregraden der Rassen FV und HF getrennt
- zwischen den Gruppen der schwach (Grad 0 und 1), mittel (Grad 2) und stark (Grad 3 und 4) betroffenen Kühen beider Rassen zusammen

- zwischen den Gruppen der schwach (Grad 0 und 1), mittel (Grad 2) und stark (Grad 3 und 4) betroffenen Kühen der Rassen FV und HF getrennt.

Für die Datenanalyse bzw. Datenmodellierung (Klassifikation) mittels SVM wurden nur die Massen verwendet, die in Bezug auf den Schweregrad sowohl in der 1-Weg-ANOVA beider Rassen zusammen, als auch der einzelnen Rassen als signifikant ($P < 0.05$) unterschiedlich erkannt wurden (Schnittmenge). Die SVM-Modelle (Klassifikatoren) wurden für die Unterscheidung von Tieren mit und ohne FLS, sowie für die Unterscheidung der schwach, mittel und stark betroffenen Tieren berechnet und bezüglich ihrer Klassifikationsfehlerrate (Prognosefehlerrate bzw. Sensitivität und Signifikanz) geprüft. Die SVM-Modelle wurden getrennt für die im Positiv-ESI-Modus und Negativ-ESI-Modus bestimmten Lipide berechnet.

5.6. Zusammenarbeit mit anderen Instituten und Abteilungen der Universität Zürich

Am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit waren neben dem Departement für Nutztiere (Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun), die folgenden Institutionen der Universität Zürich beteiligt:

- Abteilung für Veterinärtoxikologie (Prof. Dr. H. Nägeli): Zusammenarbeit mit PhD Student Sandro Imhasly und Doktorandin Malin Olson zur Entwicklung einer geeigneten Methode für die Untersuchung des Lipidoms von Kühen und zur Auswertung der gewonnenen Daten
- Functional Genomics Center Zürich FG CZ (Dr. Endre Laczko): Zurverfügungstellung von Geräten für die Massenspektrometrie und die UPLC, von Materialien, Wissen und Erfahrungen auf dem Gebiet der Metabolomik und Ausführung der statistischen Auswertung
- Institut für Veterinärpathologie (Prof. Dr. A. Pospischil): Histologische Untersuchung der Leberbiopsien durch Frau Dr. med. vet. Dipl. ECVP Maja Rütten.

5.7. Tierversuchsbewilligung

Für die Untersuchungen lag eine Tierversuchsbewilligung (10-2011) des Kantonalen Veterinäramts Zürich vor.

6. ERGEBNISSE

6.1. Gruppeneinteilung

Es wurden total 63 Leberbiopsien untersucht. Anhand der histologischen Untersuchungen wurden die Kühe wie folgt eingeteilt (Tab. 5): 14 Kühe gehörten zur Gruppe 0, 12 zur Gruppe 1, 21 zur Gruppe 2, 11 zur Gruppe 3 und 5 zur Gruppe 4. Bei 33 Tieren (52.4 %) handelte es sich um Kühe der HF- und bei 30 (47.6 %) um solche der FV-Rasse.

Tab. 5: Verteilung der 63 Kühe auf die verschiedenen Gruppen

Gruppen	Total	Rassen
Gruppe 0	14	HF 6
		FV 8
Gruppe 1	12	HF 8
		FV 4
Gruppe 2	21	HF 10
		FV 11
Gruppe 3	11	HF 5
		FV 6
Gruppe 4	5	HF 4
		FV 1

Bei 66.7 % (42 Kühe) der 63 Kühe lag mindestens eine weitere Diagnose vor. 26.2 % (11 Tiere) der 42 Kühe mit zusätzlichen Diagnosen waren Kühe ohne FLS und 73.8 % (31 Tiere) Kühe mit FLS. 31.7 % (20 Tiere) der Kühe (das sind 47.6 % der Tiere mit zusätzlichen Diagnosen) hatten zwei oder mehr weitere Diagnosen (Tab. 6 und 7). Mit 42.9 % (18 Kühe) der Tiere mit zusätzlichen Diagnosen war die Labmagenverlagerung die am häufigsten aufgetretene zusätzliche Erkrankung. Es kamen 23 zusätzliche Erkrankungen vor (Tab. 8).

Tab. 6: Verteilung der weiteren Diagnosen zwischen den Gruppen

Gruppen	zusätzliche Diagnosen	Zwei und mehr zusätzliche Diagnosen
Gruppe 0	11	6
Gruppe 1	6	2
Gruppe 2	13	5
Gruppe 3	8	4
Gruppe 4	3	3

Tab 7: Prozentuale Verteilung der zusätzlichen Diagnosen zwischen den Kühen mit und ohne FLS

Ohne FLS				
Anzahl Diagnosen	Total	Anteil an den Kühen ohne FLS (14) in %	Anteil an den Tieren mit zusätzlichen Diagnosen (42) in %	Anteil an den Kühen ohne FLS und weiteren Diagnosen (11) in %
Mind. eine	11	78.6	26.2	100.0
Nur eine	5	35.7	11.9	45.5
Zwei und mehr	6	42.9	14.3	54.5
Mit FLS				
Anzahl Diagnosen	Total	Anteil an den Kühen mit FLS (49) in %	Anteil an den Tieren mit zusätzlichen Diagnosen (42) in %	Anteil an den Kühen mit FLS und weiteren Diagnosen (31) in %
Mind. eine	31	63.3	73.8	100.0
Nur eine	17	34.7	40.5	54.8
Zwei und mehr	14	28.6	33.3	45.2

Tab 8: Verteilung der zusätzlichen Diagnosen

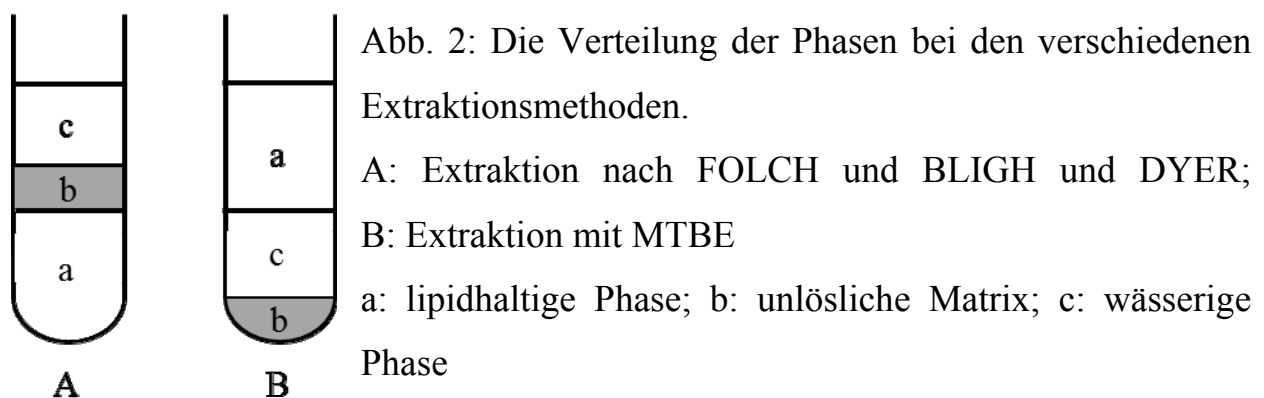
Erkrankungen	Ohne FLS	Mit FLS	Total
Nachgeburtsverhalten	1	1	2
Labmagenverlagerung	5	13	18
Ileus	1		1
Bronchopneumonie	2	6	8
Hepatitis	1		1
Blinddarmdilataion		1	1
Ketose	1	4	5
Klauenrehe	1	2	3
Hypophosphatämie		2	2
Sohlengeschwür	1	1	2
Labmagenulkus		2	2
Myopathie		1	1
Anschoppung der Colonscheibe		1	1
Toxämie	1		1
Mastitis	3	2	5
Peritonitis	1		1
Dermatitis solaris	1	1	2
Intertrigo		1	1
Endometritis	2	1	3
Peritarsitis		2	2
Lungenemphysem		1	1
Fettgewebsnekrosen		1	1
Ruptur Duodenum	1		1

6.2. Extraktionsmethoden

Bei den Extraktionen der Lipide, aus den Plasmaproben einer beliebigen Kuh, nach BLIGH und DYER (1959) und nach FOLCH (1957) befanden sich die nicht-extrahierbare unlösliche Matrix zwischen der wässrigen oberen und der lipidhaltigen organischen unteren Phase. Bei der Gewinnung des Extrakts gelangten jeweils auch Teile der unlöslichen Matrix mit in die gewonnene Flüssigkeit, folglich war immer ein kleiner unlöslicher Niederschlag ersichtlich. Es war

technisch nicht möglich die lipidhaltige Phase so zu gewinnen, dass keine unlösliche Matrix in das Extrakt gelangte.

Bei der Extraktion mit MTBE nach MATYASH et al. (2008) sammelte sich die nichtextrahierbare unlösliche Matrix am Grund des Behälters. Die lipidhaltige organische Phase war oben und die Gewinnung dieser Phase einfach. Das gewonnene Extrakt erschien makroskopisch rein (Abb. 2).



Die Chromatogramme der Extraktionen stimmten mehrheitlich überein (Abb. 3). Die Extraktion nach BLIGH und DYER (1959) ergab eine durchschnittliche Messintensität im Positiv-ESI-Modus von 1.81×10^6 und im Negativ-ESI-Modus von 1.20×10^5 . Die Extraktion nach FOLCH (1957) war mit durchschnittlichen Intensitäten von 1.68×10^6 im Positiv- und 1.21×10^5 im Negativ-ESI-Modus nur wenig unter der Extraktion nach BLIGH und DYER. Die Extraktion mit MTBE erreichte eine Intensität von 1.48×10^6 im Positiv- und 2.37×10^4 im Negativ-ESI-Modus.

Der IS Lysophosphocholin 17:0 wurde im Positiv-ESI-Modus bei allen Methoden mit einer hohen Messgenauigkeit (± 0.002 Da) gemessen (Abb. 4). Der IS wurde bei der Extraktion mit MTBE mit einer durchschnittlichen Intensität von 2.18×10^4 gemessen, bei der Extraktion nach BLIGH und DYER (1959) war die durchschnittliche Intensität 1.19×10^4 und bei der Extraktion nach FOLCH (1957) 7.00×10^3 .

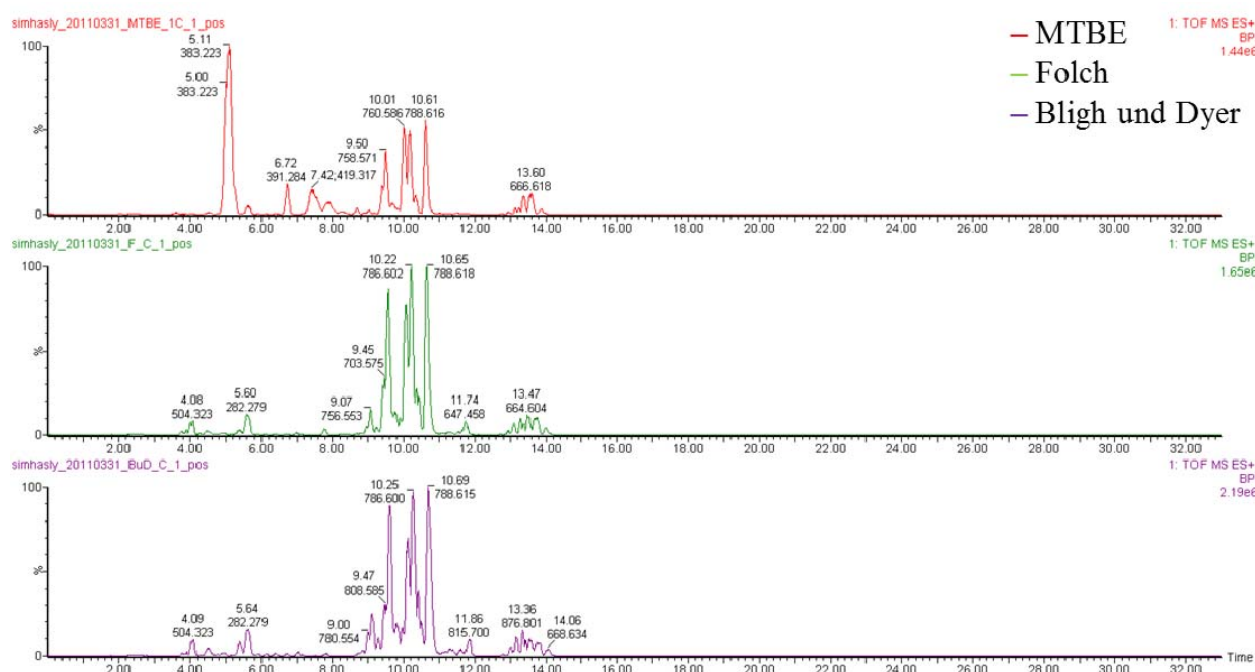


Abb. 3: Chromatogramme der Extraktionsmethoden im Positiv-ESI-Modus gemessen



Abb. 4: Vorkommen des IS Lysophosphocholin 17:0 (M+H)⁺ 510.35 in den einzelnen Extraktionen im Positiv-ESI-Modus gemessen

Der IS Palmitinsäure 1- ^{13}C wurde im Negativ-ESI-Modus bei allen Methoden mit einer hohen Messgenauigkeit ($\pm 0.002 \text{ Da}$) gemessen. In der Extraktion nach BLIGH und DYER (1959) wurde eine durchschnittliche Intensität von 3.62×10^3 gemessen. In der Extraktion mit MTBE betrug die Intensität 3.47×10^3 und in der Extraktion nach FOLCH (1957) 3.32×10^3 .

6.3. Auswertung des Vergleichs des Lipidoms von HF- und FV-Kühen

Ungeachtet dessen, ob die Kühe an FLS erkrankt waren oder nicht, wurde untersucht, ob es Unterschiede im Lipidom von Kühen der Rasse HF und FV gab. Aus der BGA (Abb. 5: Vergleich der Intensitäten aller Massen einer Gruppe als Gesamtes zwischen den verschiedenen Gruppen) geht hervor, dass die Lipidome (hier die Gesamtheit der Intensitäten der gemessenen Massen) von HF- und FV-Kühen in den Messungen im Positiv-ESI-Modus sowie im Negativ-ESI-Modus kaum unterschiedlich waren. In der 2-Weg-ANOVA-Analyse (Vergleich der Intensitäten aller Massen einer Gruppe als Gesamtes zwischen den verschiedenen Gruppen) unterschieden sich die Rassen nur bei den Messungen im Negativ-ESI-Modus als Gruppen signifikant ($P < 0.05$). Die 1-Weg-ANOVA-Analyse zum Vergleich der Intensitäten der einzelnen Massen zwischen den Gruppen ergab drei signifikant unterschiedliche Massen ($P < 0.05$). Die zwei Massen aus der Messung im Positiv-ESI-Modus waren $m/z 628.19637$ und $m/z 686.58743$; die Masse aus der Messung im Negativ-ESI-Modus war $m/z 313.054777$.

Innerhalb der Rassen unterschieden sich verschiedene Massen zwischen den Schweregraden signifikant ($P < 0.05$). So war die Masse $m/z 520.34014$ in den Messungen im Positiv-ESI-Modus nur bei der Rasse HF zwischen Kühen mit und ohne FLS signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$), jedoch nicht bei der Rasse FV (Abb. 6).

biplot of samples and m/z biplot of samples and m/z

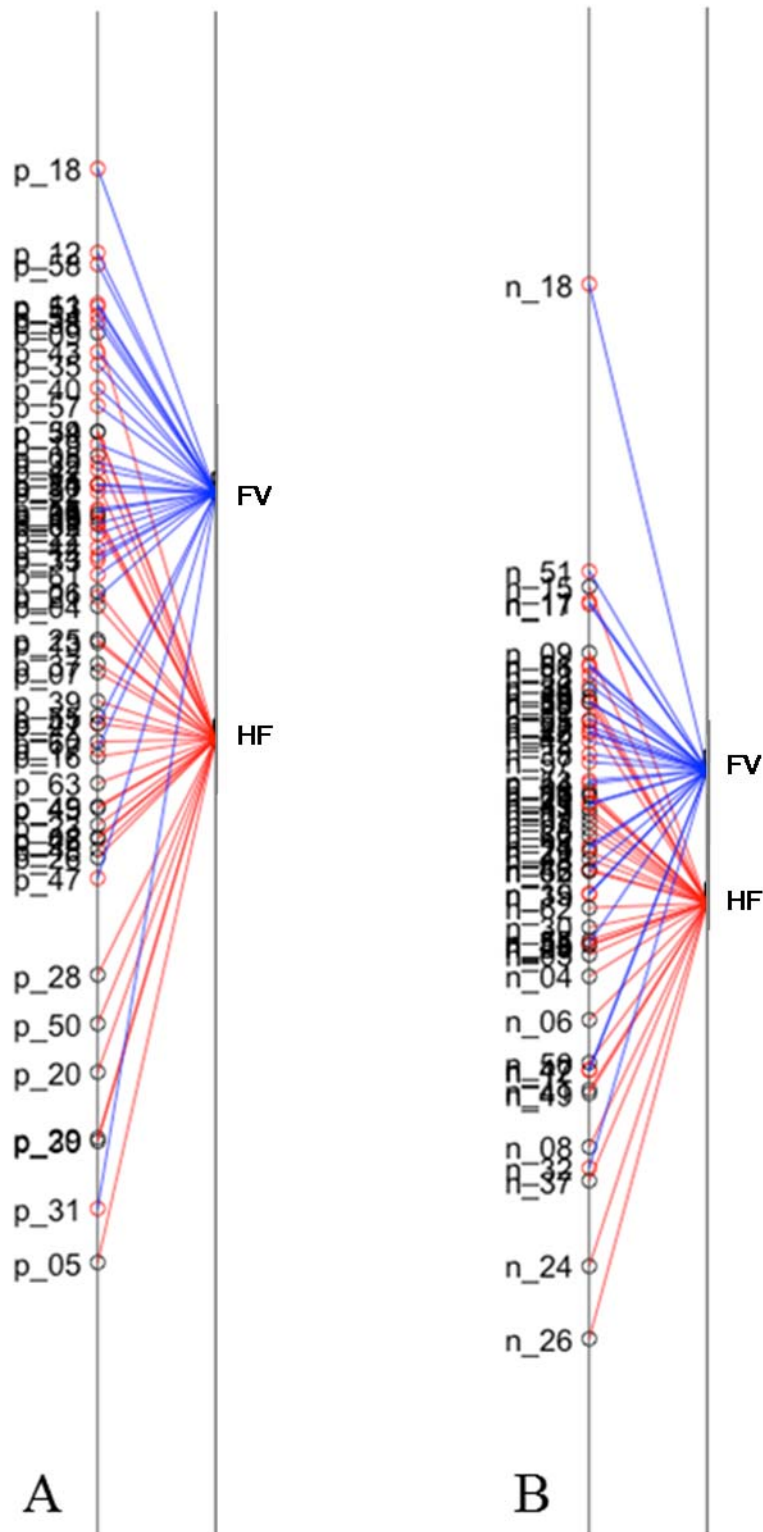


Abb. 5: BGA zwischen Kühen der Rasse HF (rot) und FV (blau) der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

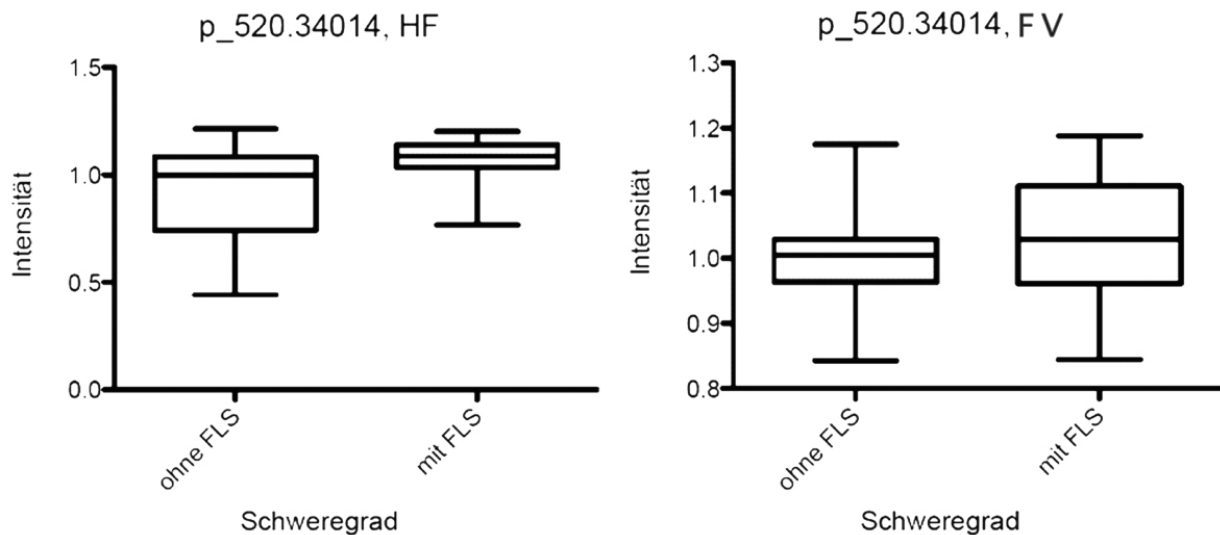


Abb. 6: Die Masse m/z 520.34014 der Messungen im Positiv-ESI-Mode im Vergleich zwischen den Rassen HF und FV in der 1-Weg-ANOVA-Analyse

Mögliche Identifikation der sich signifikant unterscheidenden Massen (Tab. 9)

Die Masse m/z 628.19637 (ein $[M+H]^+$ Ion) der Messungen im Positiv-ESI-Modus könnte ein Anthocyanidin ($C_{27}H_{31}O_{17}$) sein. Die Masse m/z 686.58743 (ein $[M+NH_4]^+$ Ion) der Messungen im Positiv-ESI-Modus könnte ein Diacylglycerol ($C_{43}H_{72}O_5$) wie das DG 20:1/20:5, das DG 20:2/20:4, das DG 18:3/22:3 etc. sein.

Die Masse m/z 313.054777 (ein $[M-H]^-$ Ion) der Messungen im Negativ-ESI-Modus könnte ein C10 Isoprenoid ($C_{10}H_{20}O_7P_2$) wie das Geranyl-Diphosphat, das Neryl-Diphosphat, das Bornyl-Diphosphat, das Chrysanthemyl-Diphosphat etc. sein.

Tab. 9: Mögliche Identitäten der sich signifikant unterscheidenden Massen vom Vergleich der Rassen

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z		
(M+NH ₄) ⁺ 686.58743	Diacylglycerol	C ₄₃ H ₇₂ O ₅
(M+H) ⁺ 628.19637	Anthocyanidin	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₇
Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z		
(M-H) ⁻ 313.054777	C10 Isoprenoid	C ₁₀ H ₂₀ O ₇ P ₂

6.4. Auswertung des Lipidomvergleichs

6.4.1. Auswertung des Vergleichs aller Gruppen und der Kühe mit und ohne FLS

Kühe beider Rassen

Die Between Group Analysis (BGA) der Tiere mit und ohne FLS ergab deutlichere Unterschiede in den Messungen im Positiv-ESI-Modus als in den Messungen im Negativ-ESI-Modus. In den Messungen im Negativ-ESI-Modus waren die Unterschiede klein (Abb. 8). In der 2-Weg-ANOVA-Analyse unterschieden sich die Kühe mit FLS von den Kühen ohne FLS in den Messungen im Positiv- und Negativ-ESI-Modus signifikant ($P < 0.05$).

Die BGA der Tiere mit unterschiedlichen Schweregraden ergab bei den Messungen im Positiv- und Negativ-ESI-Modus kaum Unterschiede (Abb. 7). Das gleiche Bild zeigte sich in der Auswertung mit der 2-Weg-ANOVA-Analyse. Die Schweregrade unterschieden sich nur bei den Messungen im Positiv-ESI-Modus signifikant ($P < 0.05$). Die Unterschiede bei den Messungen im Negativ-ESI-Modus waren hingegen nicht signifikant ($P > 0.05$).

Die 1-Weg-ANOVA-Analysen ergaben für die Messungen im Positiv- sowie im Negativ-ESI-Modus verschiedene Massen, die sich signifikant ($P < 0.05$) unterschieden sowohl zwischen Kühen mit und ohne FLS, als auch zwischen den einzelnen Schweregraden (Tab. 10).

Tab. 10: Zusammenfassung aller sich signifikant unterscheidenden Massen

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z			Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z	
288.28880	520.34014	758.58766	266.124391	487.319855
331.17002	521.34350	760.91880	307.131209	498.281102
415.21344	531.45177	784.57986	307.131309	514.279130
450.31999	533.32854	785.58544	313.054777	515.283856
468.43458	628.19637	788.95619	407.263507	564.331090
490.42605	686.58743		448.295060	578.348406
500.30094	714.54353		473.217275	585.333269

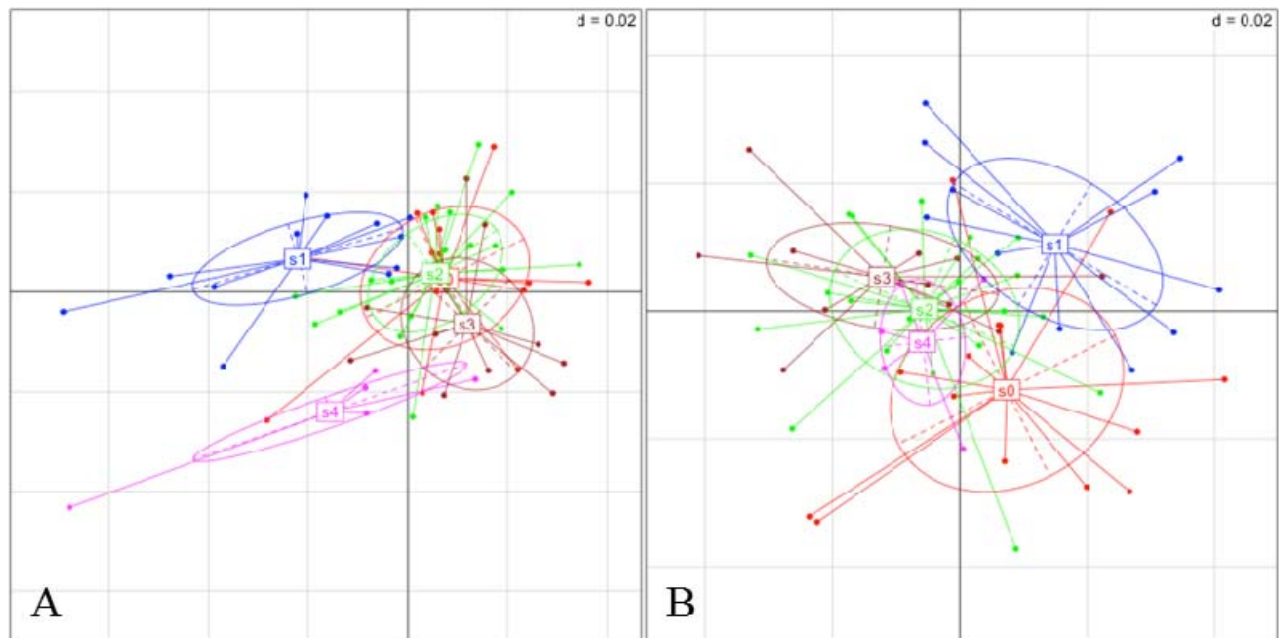


Abb. 7: BGA zwischen Kühen mit verschiedenen Schweregraden (Gruppe 0 = s0, rot; Gruppe 1 = s1, blau; Gruppe 2 = s2, grün; Gruppe 3 = s3, braun, Gruppe 4 = s4, violett) der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

biplot of samples and m/z biplot of samples and m/z

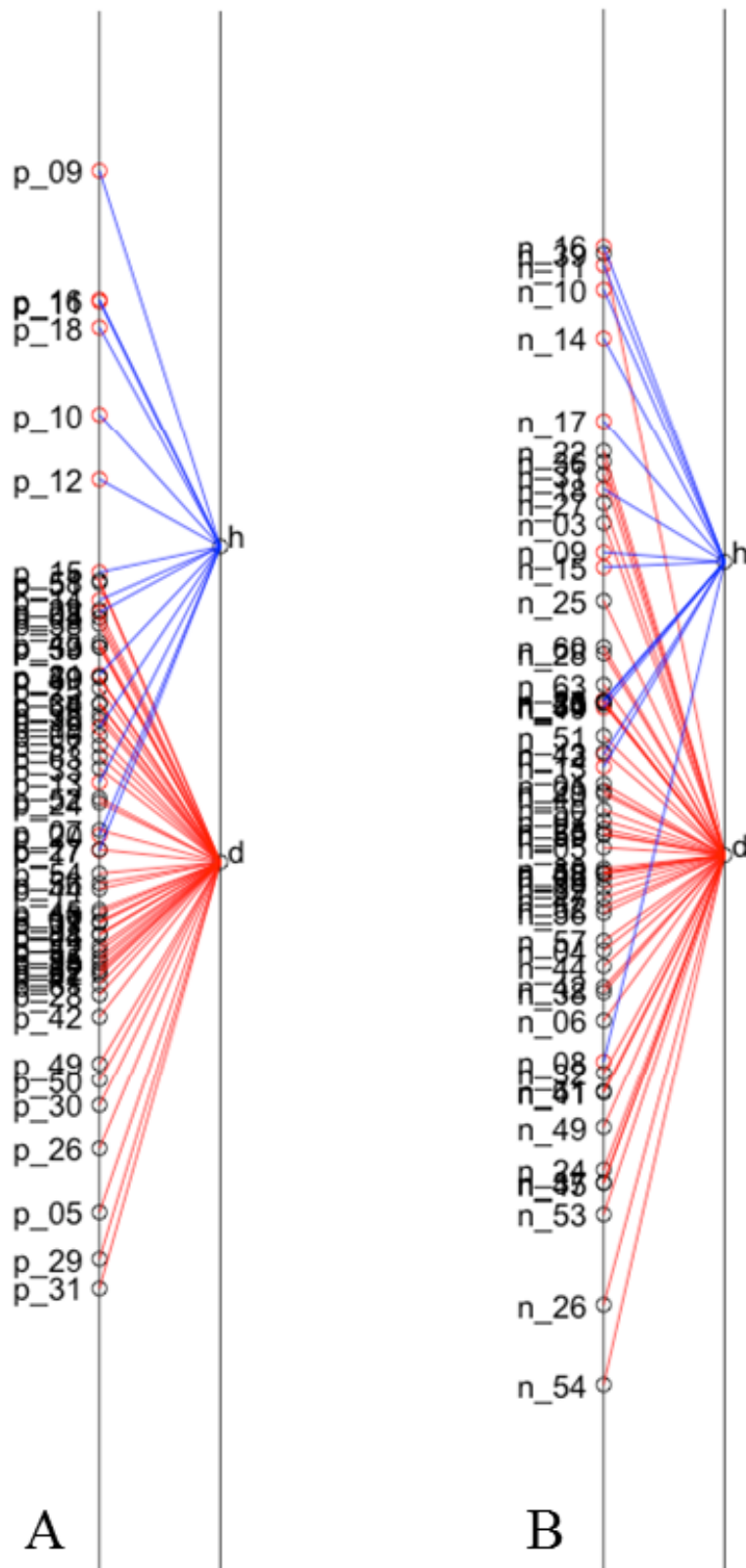


Abb. 8: BGA zwischen Tieren mit (rot, d) und ohne (blau, h) FLS der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

Kühe der Rasse HF

Die BGA der Rasse HF mit und ohne FLS ergab deutlichere Unterschiede in den Messungen im Positiv- als im Negativ-ESI-Modus. Im Negativ-ESI-Modus waren die Unterschiede sehr klein (Abb. 9). In der 2-Weg-ANOVA-Analyse unterschieden sich die Kühe mit FLS von den Kühen ohne FLS in den Messungen im Positiv-ESI-Modus signifikant ($P < 0.05$). In den Messungen im Negativ-ESI-Modus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($P > 0.05$).

Die BGA der Tiere mit unterschiedlichen Schweregraden ergab bei den Messungen im Positiv-ESI-Modus nur kleine und in den Messungen im Negativ-ESI-Modus kaum Unterschiede (Abb. 10). Das gleiche Bild zeigte sich in der Auswertung mit 2-Weg-ANOVA. Die Schweregrade unterschieden sich nur bei den Messungen im Positiv-ESI-Modus signifikant ($P < 0.05$), die Unterschiede bei den Messungen im Negativ-ESI-Modus waren nicht signifikant ($P > 0.05$).

Die 1-Weg-ANOVA-Analysen ergaben für die Messungen im Positiv- sowie im Negativ-ESI-Modus verschiedene Massen, die sich signifikant ($P < 0.05$) unterschieden sowohl zwischen Kühen mit und ohne FLS, als auch zwischen den einzelnen Schweregraden (Tab. 11).

Tab. 11: Zusammenfassung aller sich signifikant unterscheidenden Massen ($P < 0.05$) der Rasse HF

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z			Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z	
268.99938	468.43458	758.58766	266.778352	498.281102
288.28880	520.34014	758.90269	268.774521	514.279130
383.11896	521.34350	784.57986	270.774809	578.348406
415.21344	533.32854	788.95619	313.054777	585.333269
462.35150	686.58743		487.319855	

biplot of samples and m/z biplot of samples and m/z

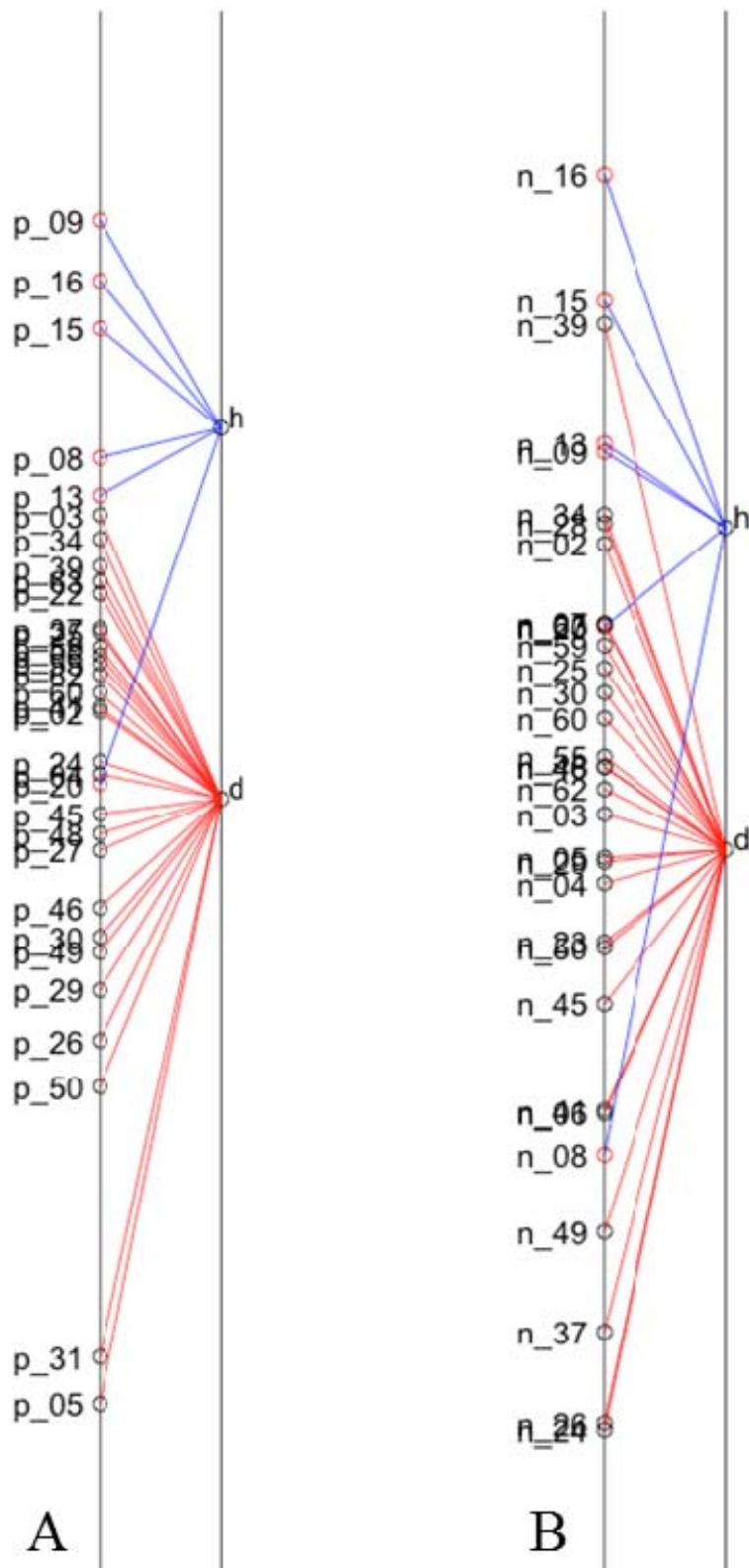


Abb. 9: BGA zwischen Tieren mit (rot, d) und ohne (blau, h) FLS der Rassen HF der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

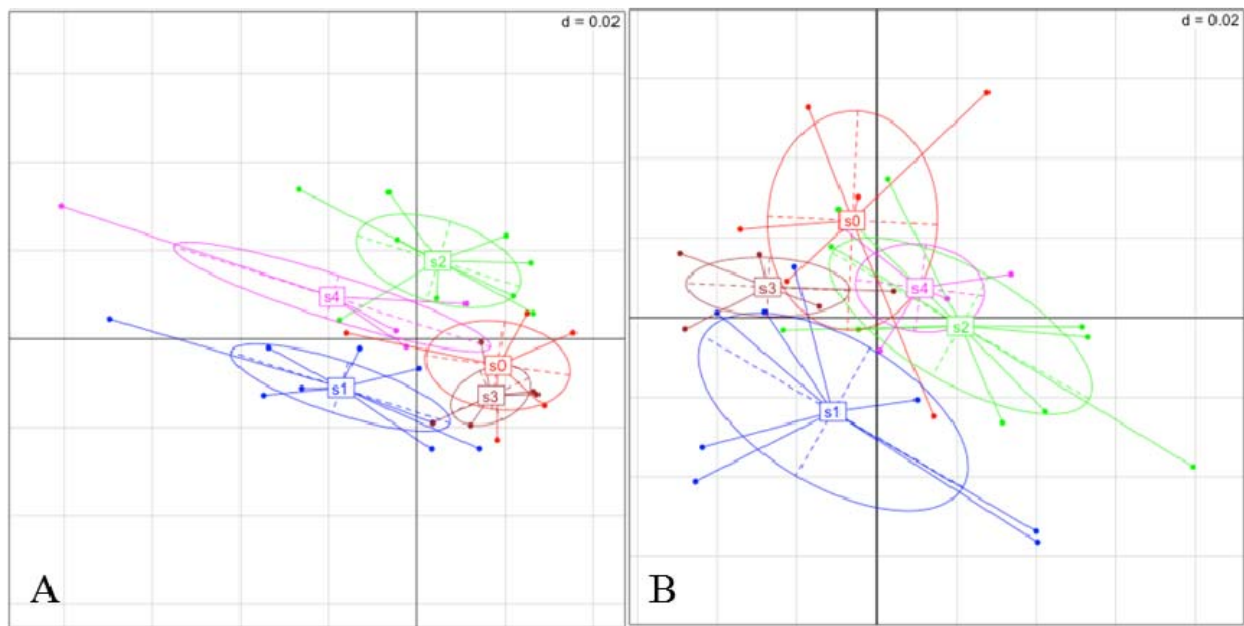


Abb. 10: BGA zwischen Kühen der Rasse HF mit verschiedenen Schweregraden (Gruppe 0 = s0, rot; Gruppe 1 = s1, blau; Gruppe 2 = s2, grün; Gruppe 3 = s3, braun, Gruppe 4 = s4, violett) der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

Kühe der Rasse FV

Die BGA der Rasse FV mit und ohne FLS ergab leichte Unterschiede in den Messungen im Negativ- und im Positiv-ESI-Modus (Abb. 12). In den Messungen im Positiv-ESI-Modus waren die Unterschiede deutlicher. Die 2-Weg-ANOVA-Analyse der Kühe mit und ohne FLS ergab in den Messungen im Positiv- und im Negativ-ESI-Modus keine signifikanten Unterschiede ($P > 0.05$).

Die BGA der Tiere mit unterschiedlichen Schweregraden ergab bei den Messungen im Positiv- und im Negativ-ESI-Modus Unterschiede (Abb. 11). In den Messungen im Positiv-ESI-Modus waren die Unterschiede deutlicher. Das gleiche Bild zeigte sich in der Auswertung mit der 2-Weg-ANOVA-Analyse. Die Schweregrade unterschieden sich nur bei den Messungen im Positiv-ESI-Modus signifikant ($P < 0.05$). Die Unterschiede bei den Messungen im Negativ-ESI-Modus waren nicht signifikant ($P > 0.05$).

Die 1-Weg-ANOVA-Analysen ergaben für die Messungen im Positiv- sowie im Negativ-ESI-Modus verschiedene Massen, die sich signifikant ($P < 0.05$) unterschieden, zum einen zwischen Kühen mit und ohne FLS zum anderen zwischen den einzelnen Schweregraden (Tab. 12).

Tab. 12: Zusammenfassung aller sich signifikant unterscheidenden Massen ($P < 0.05$) der Rasse FV

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z		Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z	
288.28880	466.31171	307.131209	498.281102
331.17002	468.43458	307.131309	514.279130
383.11896	500.30094	407.263507	515.283856
415.21344	533.32854	448.295060	564.331090
450.31999	758.58766	487.319855	578.348406

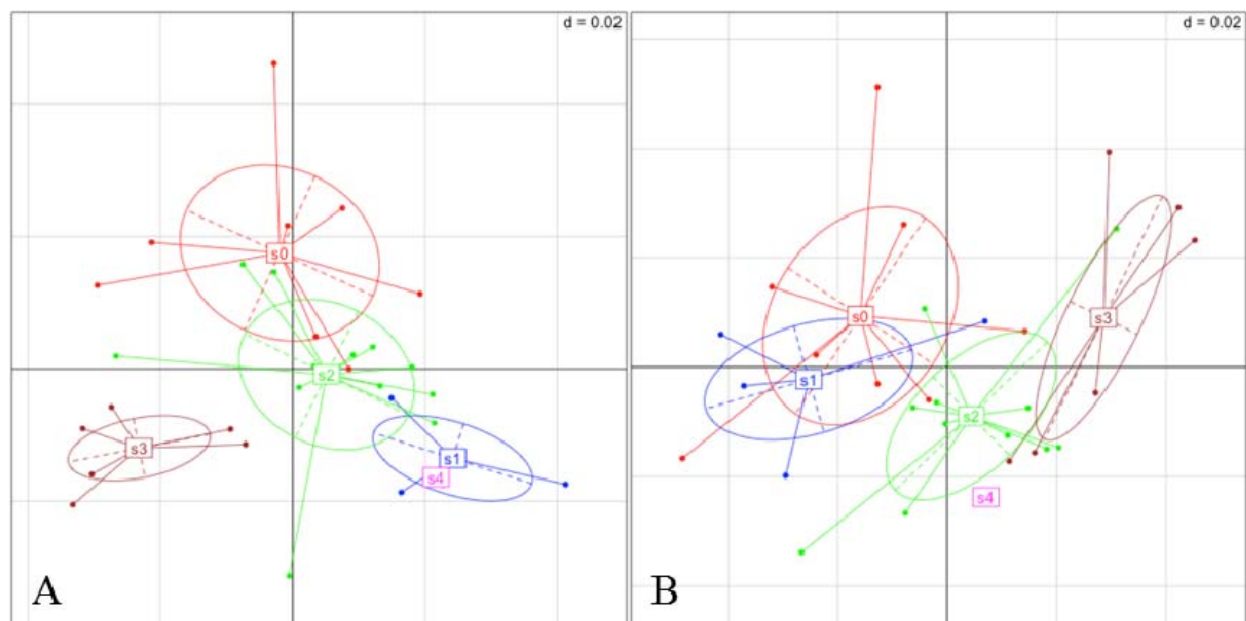


Abb. 11: BGA zwischen Kühen der Rasse FV mit verschiedenen Schweregraden (Gruppe 0 = s0, rot; Gruppe 1 = s1, blau; Gruppe 2 = s2, grün; Gruppe 3 = s3, braun, Gruppe 4 = s4, violett) der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

biplot of samples and m/z biplot of samples and m/z

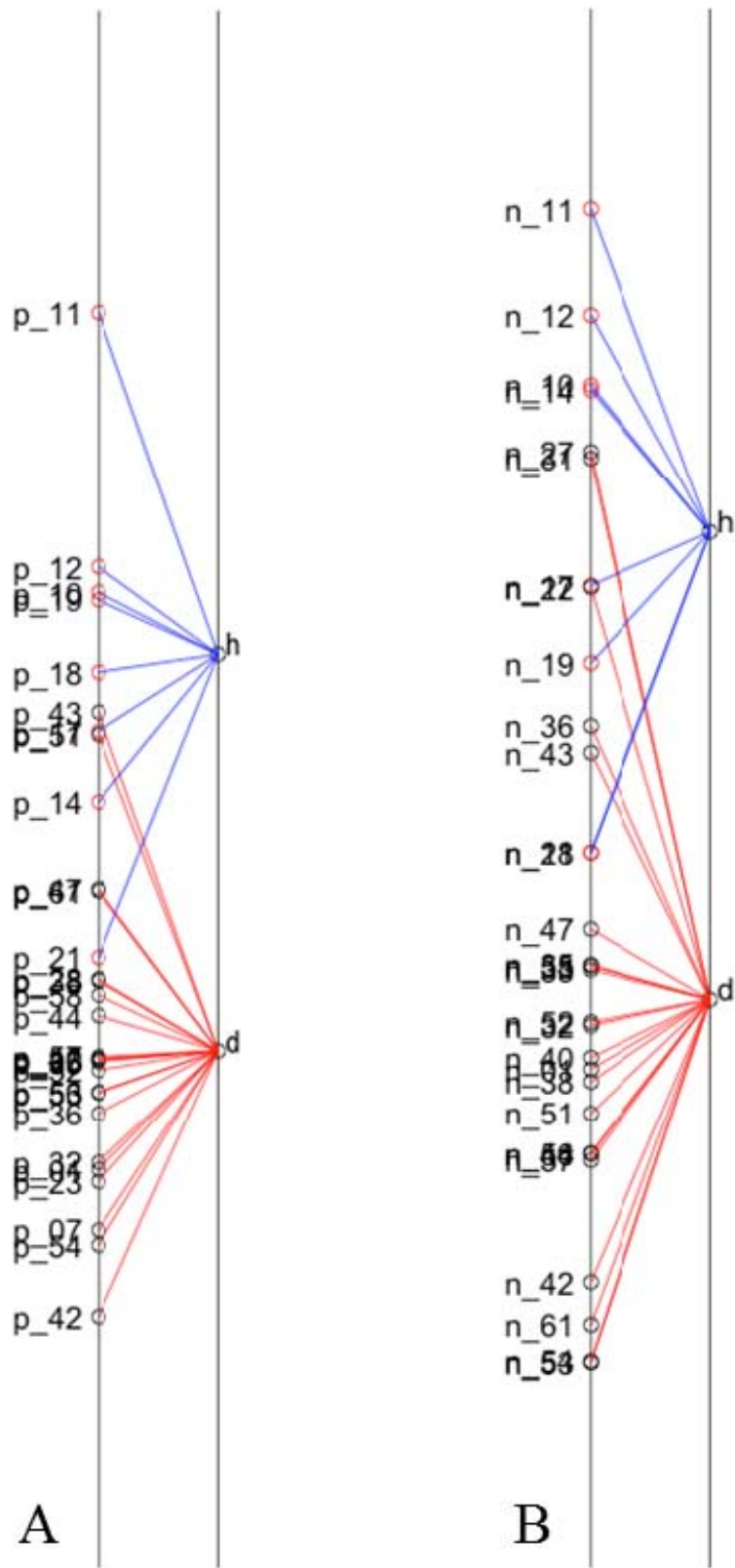


Abb. 12: BGA zwischen Tieren mit (rot, d) und ohne (blau, h) FLS der Rasse FV der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

Zusammenfassung

Es wurden in den Messungen im Positiv- sowie im Negativ-ESI-Modus sehr viele verschiedene signifikant unterschiedliche Massen gefunden. Nur wenige Massen kamen kontinuierlich bei den Untersuchungen mit beiden Rassen und bei den einzelnen Rassen vor (Tab. 13).

Die Massen waren in den einzelnen Gruppen sehr unterschiedlich verteilt (Abb. 13). Sie unterschieden sich nicht zwischen allen Schweregraden und es gab keine kontinuierliche Steigerung oder Senkung der Mittelwerte der Massen von Grad 0 bis Grad 4 des FLS. Die meisten Massen unterschieden sich nicht zwischen allen Gruppen untereinander signifikant, sondern nur zwischen einzelnen Gruppen.

Zusammengefasst gab es in den Messungen im Negativ-ESI-Modus kaum signifikante Unterschiede, weder zwischen Kühen mit und ohne FLS noch zwischen den verschiedenen Schweregraden. Zwischen den einzelnen Massen jedoch gab es signifikante Unterschiede. Die meisten Unterschiede zwischen den Gruppen kamen in den Messungen im Positiv-ESI-Modus vor. Hier ergaben sich auch mehr Massen, die sich signifikant unterschieden und die bei beiden Rassen vorkamen (Tab. 14).

Tab. 13: Zusammenfassung aller sich signifikant unterscheidenden Massen ($P < 0.05$), die kontinuierlich vorkamen

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z	Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z
288.28880	498.281102
415.21344	514.279130
468.43458	578.348406
533.32854	
758.58766	

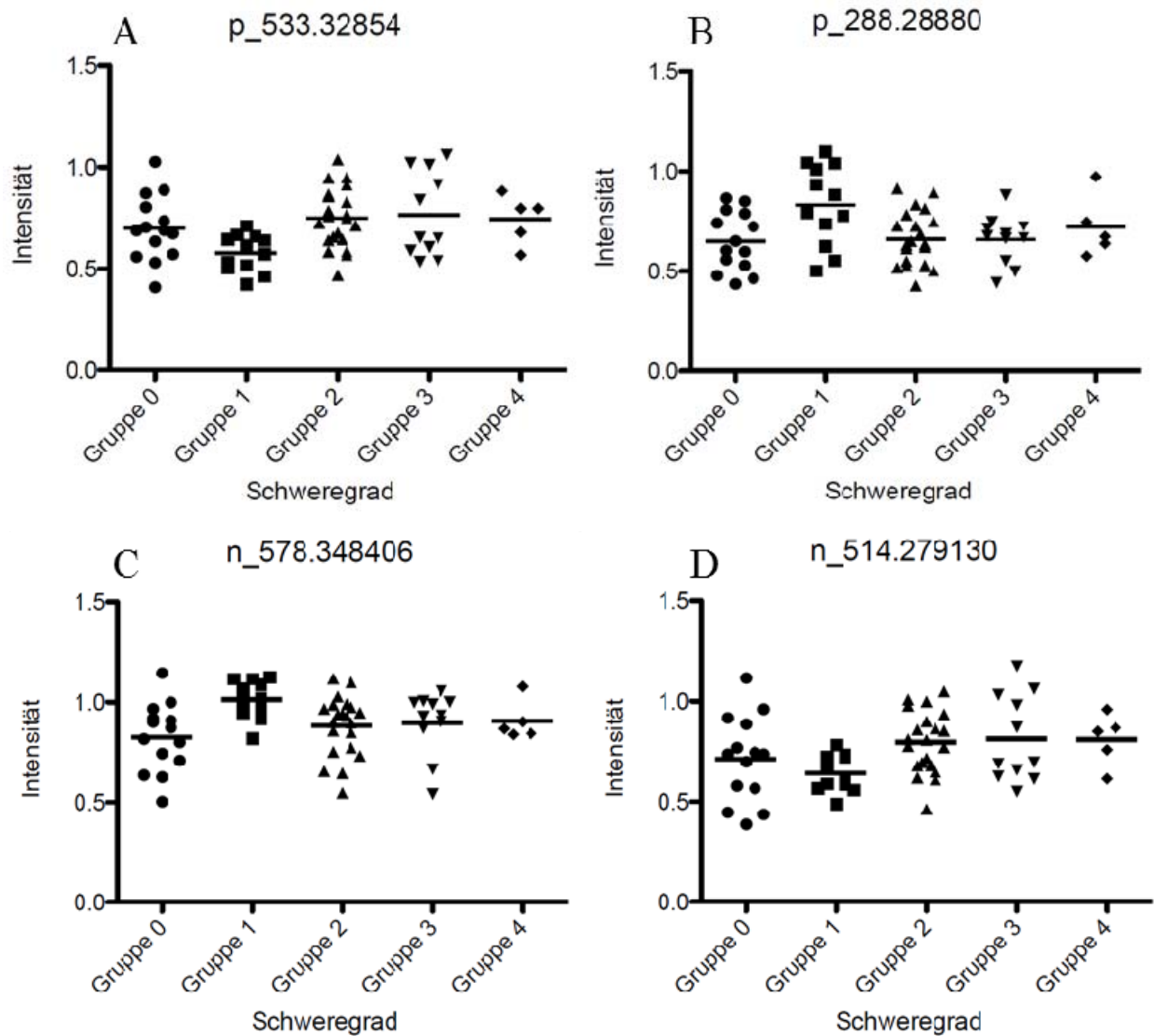


Abb. 13: 2-Weg-ANOVA-Analyse von je zwei Massen aus den Messungen im Negativ- und Positiv-ESI-Modus, die bei beiden Rassen vorkamen. A: Masse aus der Messung im Positiv-ESI-Modus m/z 533.32854; B: Masse aus der Messung im Positiv-ESI-Modus m/z 288.28880; C: Masse aus der Messung im Negativ-ESI-Modus m/z 578.348406; D: Masse aus der Messung im Negativ-ESI-Modus m/z 514.279130

Tab. 14: Zusammenfassung der Unterschiede

- + signifikante Unterschiede vorhanden
- keine signifikanten Unterschiede vorhanden

	mit FLS vs. ohne FLS		alle Schweregrade	
	Messungen im Positiv-ESI-Modus	Messungen im Negativ-ESI-Modus	Messungen im Positiv-ESI-Modus	Messungen im Negativ-ESI-Modus
Beide Rassen	+	+	+	-
HF	+	-	+	-
FV	-	-	+	-

Mögliche Identifikation der sich signifikant unterscheidenden Massen (Tab. 15)

Die Masse m/z 533.32854, ein $(M+H)^+$ Ion, der Messungen im Positiv-ESI-Modus könnte das Glycerophosphoglycerol 20:4/0:0 ($C_{26}H_{45}O_9P$), das Cholesterolderivat Cucurbitacin J ($C_{30}H_{44}O_8$), das Vitamin D3-Derivat Dihydroxyoxavitamin D3 ($C_{31}H_{48}O_7$) oder das Sulfat 5 β -Cyprinolsulfat ($C_{27}H_{48}O_8S$) sein. Die Masse m/z 415.21344, ein $(M+H)^+$ Ion, der Messungen im Positiv-ESI-Modus könnte ein Eicosanoid ($C_{21}H_{34}O_8$), das Flavanon Laxiflorin ($C_{23}H_{26}O_7$) oder das Flavanon Heteroflavanon C ($C_{23}H_{26}O_7$) sein. Die Masse m/z 758.58766, ein $(M+H)^+$ Ion, der Messungen im Positiv-ESI-Modus könnte ein Diacylglycerophosphocholin ($C_{42}H_{80}NO_8P$ oder $C_{43}H_{84}NO_7P$) oder ein Diacylglycerophosphoethanolamin ($C_{42}H_{80}NO_8P$) sein. Die Masse m/z 288.28880, ein $(M+H)^+$ Ion, der Messungen im Positiv-ESI-Modus könnte das Sphingoid C17 Sphinganin ($C_{17}H_{37}NO_2$) oder das Sphingoid Prosopinin ($C_{16}H_{33}NO_3$) sein. Die Masse m/z 468.43458, ein $(M+NH_4)^+$ Ion, der Messungen im Positiv-ESI-Modus könnte ein Ergosterol ($C_{28}H_{50}O_4$) wie 6-Deoxocastasteron, ein C20 Isoprenoid ($C_{30}H_{58}O_2$), der Wachsmonoester Myristyl Oleat ($C_{30}H_{58}O_2$) oder die Fettsäure Triaconensäure ($C_{30}H_{58}O_2$) sein. Die Masse m/z 514.2791, ein $(M-H)^-$ Ion, der Messungen im Negativ-ESI-Modus könnte das Steroidkonjugat Taurocholsäure, Taurohyocholsäure, Tauro- β -muri-cholsäure oder Tauroursocholsäure ($C_{26}H_{45}NO_7S$) sein. Die Masse m/z

498.281102, ein $(M-H)^-$ Ion, der Messungen im Negativ-ESI-Modus könnte das Steroidkonjugat Taurochenodeoxycholsäure, Taurodeoxycholsäure oder Tauroursodeoxycholsäure ($C_{26}H_{45}NO_6S$) sein. Die Masse m/z 578.348406, ein $(M-H)^-$ Ion, der Messungen im Negativ-ESI-Modus könnte das Monoacylglycerophosphoserin PS 22:1/0:0 ($C_{28}H_{54}NO_9P$) sein.

Tab. 15: Mögliche Identitäten der kontinuierlich vorkommenden Massen der Messungen im Positiv- und Negativ-ESI-Modus

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z		
$(M+H)^+$ 288.28880	C17 Sphingalin Prosopinin	$C_{17}H_{37}NO_2$ $C_{16}H_{33}NO_3$
$(M+H)^+$ 415.21344	Eicosanoid Laxiflorin Heteroflavanon C	$C_{21}H_{34}O_8$ $C_{23}H_{26}O_7$ $C_{23}H_{26}O_7$
$(M+NH_4)^+$ 468.43458	Ergosterol C20 Isoprenoid Myristyl Oleat Triacensäure	$C_{28}H_{50}O_4$ $C_{30}H_{58}O_2$ $C_{30}H_{58}O_2$ $C_{30}H_{58}O_2$
$(M+H)^+$ 533.32854	Glycerophosphoglycerol 20:4/0:0 Cucurbitacin J Dihydroxyoxavitamin D3 5 β -Cyprinolsulfat	$C_{26}H_{45}O_9P$ $C_{30}H_{44}O_8$ $C_{31}H_{48}O_7$ $C_{27}H_{48}O_8S$
$(M+H)^+$ 758.58766	Diacylglycerophosphocholin Diacylglycerophosphoethanolamin	$C_{42}H_{80}NO_8P$ $C_{43}H_{84}NO_7P$
Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z		
$(M-H)^-$ 498.281102	Taurochenodeoxycholsäure Taurodeoxycholsäure Tauroursodeoxycholsäure	$C_{26}H_{45}NO_6S$
$(M-H)^-$ 514.279130	Taurocholsäure Taurohyocholsäure Tauro- β -muricholsäure Tauroursocholsäure	$C_{26}H_{45}NO_7S$
$(M-H)^-$ 578.348406	PS 22:1/0:0	$C_{28}H_{54}NO_9P$

6.4.2. Auswertung des Vergleichs der Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühen

Kühe beider Rassen

Die BGA der Gruppen schwach (Grad 0 und 1), mittel (Grad 2) und stark (Grad 3 und 4) betroffenen Kühe ergab in den Messungen im Positiv-ESI-Modus Unterschiede, jedoch keine in den Messungen im Negativ-ESI-Modus (Abb. 14). In der 2-Weg-ANOVA-Analyse unterschieden sich die Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühe in den Messungen im Positiv-ESI-Modus signifikant ($P < 0.05$) voneinander, jedoch nicht in den Messungen im Negativ-ESI-Modus ($P > 0.05$).

Die 1-Weg-ANOVA-Analysen ergaben für die Messungen im Positiv- sowie im Negativ-ESI-Modus verschiedene sich signifikant ($P < 0.05$) unterscheidende Massen (Tab. 16).

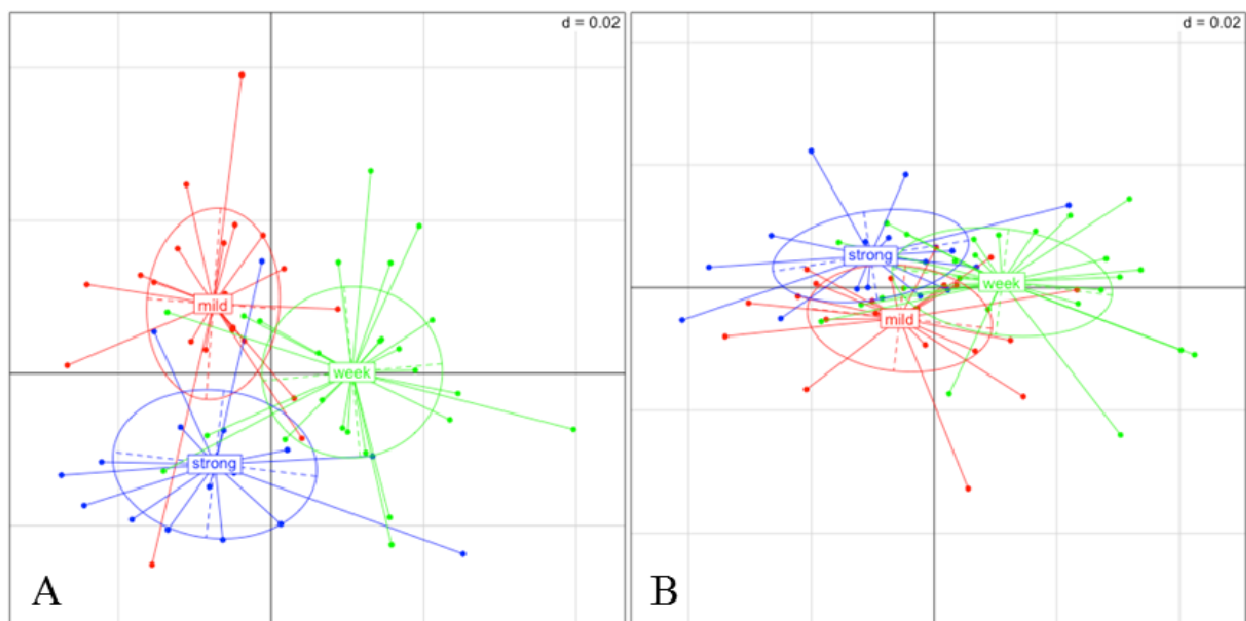


Abb. 14: BGA der Gruppen schwach (Grad 0 und 1, grün), mittel (Grad 2, rot) und stark (Grad 3 und 4, blau) der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

Tab. 16: Zusammenfassung aller sich signifikant unterscheidenden Massen

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z		Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z	
450.31999	490.42605	307.131209	464.291243
462.35150	500.30094	307.131309	487.319855
466.31171	531.45177	407.263507	498.281102
468.43458	533.32854	448.29506	514.279130

Kühe der Rasse HF

Die BGA der Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühe ergab in den Messungen im Positiv-ESI-Modus Unterschiede, jedoch keine in den Messungen im Negativ-ESI-Modus (Abb. 15). In der 2-Weg-ANOVA-Analyse unterschieden sich die Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühen weder in den Messungen im Positiv- noch im Negativ-ESI-Modus signifikant voneinander ($P > 0.05$).

In der 1-Weg-ANOVA-Analysen unterschieden sich in den Messungen im Positiv- sowie im Negativ-ESI-Modus verschiedene Massen signifikant ($P < 0.05$) (Tab. 17).

Tab. 17: Zusammenfassung aller sich signifikant unterscheidenden Massen ($P < 0.05$) der Rasse HF

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z	Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z
383.11896	266.778352
758.58766	268.774521
468.43458	270.774809
	487.319855

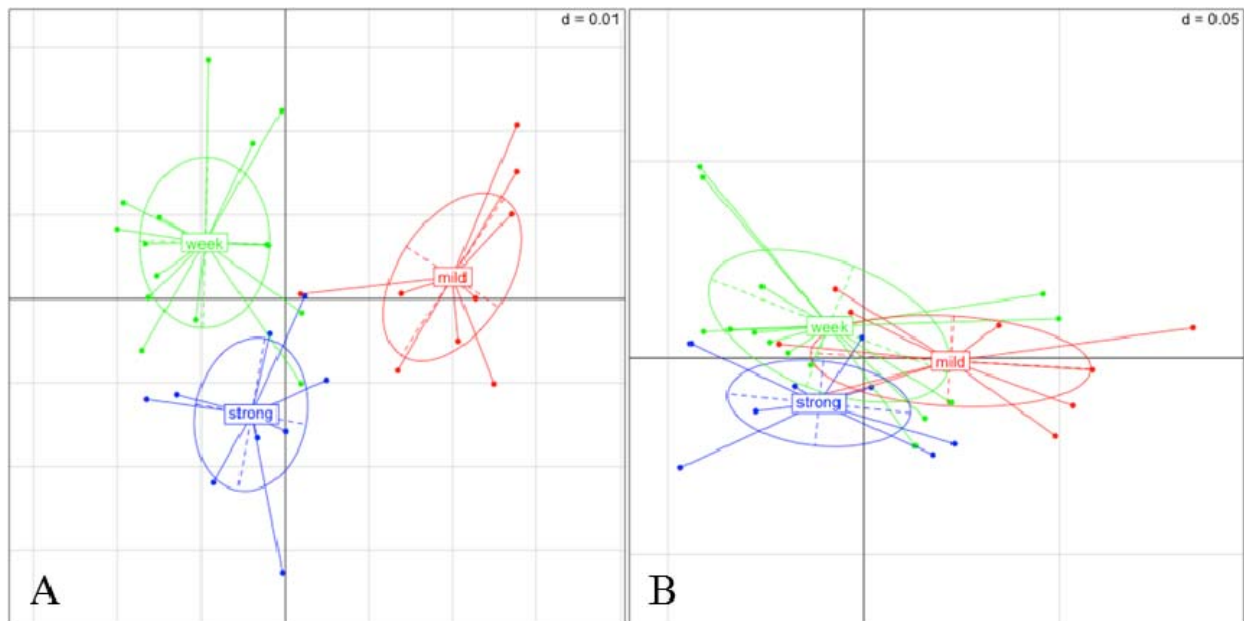


Abb. 15: BGA der Gruppen schwach (Grad 0 und 1, grün), mittel (Grad 2, rot) und stark (Grad 3 und 4, blau) der Rasse HF der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

Kühe der Rasse FV

Die BGA der Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühe ergab in den Messungen im Positiv-ESI-Modus Unterschiede, jedoch nur leichte Unterschiede in den Messungen im Negativ-ESI-Modus (Abb. 16). In der 2-Weg-ANOVA-Analyse unterschieden sich die Gruppen nur in den Messungen im Positiv-ESI-Modus signifikant ($P < 0.05$) voneinander, in den Messungen im Negativ-ESI-Modus waren die Unterschiede der Gruppen nicht signifikant ($P > 0.05$).

In der 1-Weg-ANOVA-Analysen unterschieden sich in den Messungen im Positiv- sowie im Negativ-ESI-Modus verschiedene Massen signifikant ($P < 0.05$) (Tab. 18).

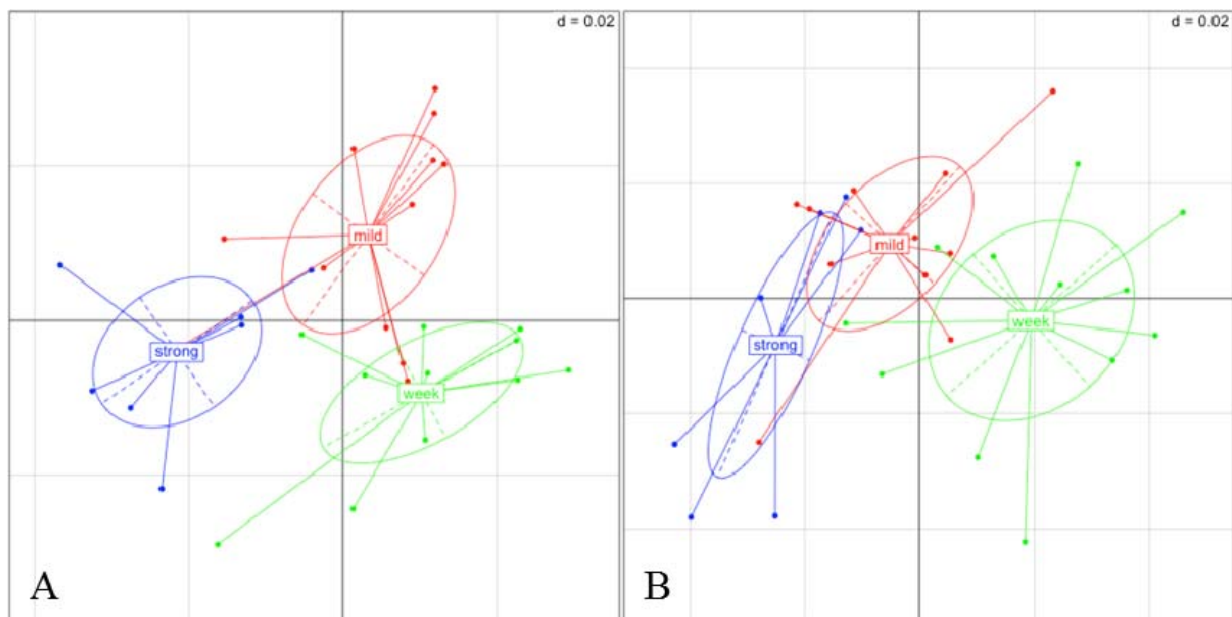


Abb. 16: BGA der Gruppen schwach (Grad 0 und 1, grün), mittel (Grad 2, rot) und stark (Grad 3 und 4, blau) der Rasse FV der Messungen im Positiv- (A) und Negativ- (B) ESI-Modus

Tab. 18: Zusammenfassung aller sich signifikant unterscheidenden Massen ($P < 0.05$) der Rasse FV

Messungen im Positiv-ESI-Modus, m/z		Messungen im Negativ-ESI-Modus, m/z	
300.29028	466.31171	266.778352	464.291243
301.29313	468.43458	307.131209	498.281102
331.17002	500.30094	307.131309	514.279130
450.31999	533.32854	407.263507	515.283856
		448.295060	

Zusammenfassung

In den Messungen im Positiv- sowie im Negativ-ESI-Modus wurden signifikant unterschiedliche Massen gefunden. Nur in den Messungen im Positiv-ESI-Modus kam eine einzelne Masse kontinuierlich vor: m/z 468.43458, ein $(M+NH_4)^+$ Ion. Zusammenfassend waren die meisten Unterschiede in den Messungen im Positiv-ESI-Modus zu finden (Tab. 19).

Die Massen der Messungen im Positiv-ESI-Modus zeigten im Allgemeinen eine gute Verteilung. Die Intensitäten nahmen mit dem Schweregrad des FLS tendenziell zu oder (Abb. 17).

Tab. 19: Zusammenfassung der Unterschiede der schwach, mittel und stark betroffenen Tiere

- + signifikante Unterschiede vorhanden
- keine signifikanten Unterschiede vorhanden

	Messungen im Positiv-ESI-Modus	Messungen im Negativ-ESI-Modus
Beide Rassen	+	-
HF	-	-
FV	+	-

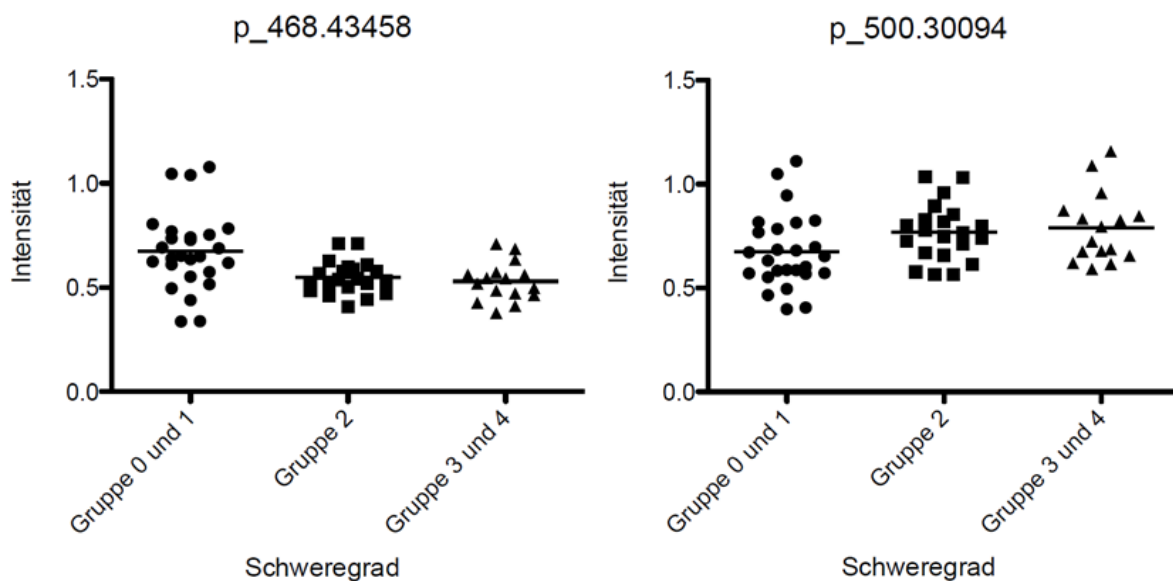


Abb. 17: Verteilung der Massen m/z 468.43458 und 500.30094 der Messungen im Positiv-ESI-Modus in der 2-Weg-ANOVA-Analyse, wobei sich m/z 468.43458 tendenziell absteigend und m/z 500.30094 tendenziell aufsteigend verteilte

Mögliche Identifikation der sich signifikant unterscheidenden Massen

Die Masse m/z 468.43458, ein $(M+NH_4)^+$ Ion, der Messungen im Positiv-ESI-Modus könnte ein Ergosterol ($C_{28}H_{50}O_4$) wie 6-Deoxocastasteron, ein C20 Isoprenoid ($C_{30}H_{58}O_2$), der Wachsmoester Myristyl Oleat ($C_{30}H_{58}O_2$) oder die Fettsäure Triaconensäure ($C_{30}H_{58}O_2$) sein.

6.4.3. Auswertung des Lipidoms mit der Support Vector Machine (SVM)

Tiere mit und ohne FLS

Bei der Berechnung für die Daten der Messungen im Positiv-ESI-Modus betrug die totale Richtigkeit bei einer 10-fachen Kreuzvalidierung 76.2 % (einzelne Richtigkeiten: 100 %, 100 %, 83.3 %, 42.9 %, 66.7 %, 83.3 %, 71.4 %, 66.7 %, 66.7 %, 85.7 %) und die Fehlerrate 23.8 %.

Im Gegensatz dazu wurden keine Tiere richtig als Kühe ohne FLS eingestuft, aber die meisten Tiere mit FLS wurden richtig eingestuft (Tab. 20). Die Sensitivität dieser Voraussage betrug 97.9 % und die Spezifität 0 %.

Tab. 20: Übersicht über eine mögliche Verteilung der richtigen und falschen Voraussagen der SVM der Messungen im Positiv-ESI-Modus

Diagnose	Voraussage	
	Mit FLS	Ohne FLS
Mit FLS	48	1
Ohne FLS	14	0

Bei der Berechnung für die Daten der Messungen im Negativ-ESI-Modus betrug die totale Richtigkeit bei einer 10-fachen Kreuzvalidierung 76.2 % (einzelne Richtigkeiten: 100 %, 66.7 %, 50 %, 100 %, 100 %, 50 %, 57.1 %, 66.7 %, 83.3 %, 85.7 %) und die Fehlerrate 19.0 %.

Alle Tiere mit FLS wurden richtig eingestuft, aber die meisten Tiere ohne FLS wurden als Tiere mit FLS eingeteilt (Tab. 21). Die Sensitivität dieser Voraussage betrug 100 % und die Spezifität 14.3 %.

Tab. 21: Übersicht über eine mögliche Verteilung der richtigen und falschen Voraussagen der SVM der Messungen im Negativ-ESI-Modus

Diagnose	Voraussage	
	Mit FLS	Ohne FLS
Mit FLS	49	0
Ohne FLS	12	2

Tiere mit schwach, mittel und stark eingestuftem FLS

Bei der Berechnung für die Daten der Messungen im Positiv-ESI-Modus betrug die totale Richtigkeit bei einer 10-fachen Kreuzvalidierung 60.3 % (einzelne Richtigkeiten: 0 %, 100 %, 83.3 %, 85.7 %, 83.3 %, 66.7 %, 71.4 %, 33.3 %, 66.7 %, 57.1 %) und die Fehlerrate 34.9 %.

Viele Tiere wurden richtig der Gruppe mit schwachem FLS und zur Gruppe mit mittlerem und starkem FLS zusammen zugeteilt. Die Sensitivität dieser Voraussage betrug für die mittel und stark eingestuften Kühe zusammen 67.6 %, nur für die mittel eingestuften Kühe betrug die Sensitivität 66.7 % und für die stark eingestuften Kühe 31.3 %. Die Spezifität betrug 84.6 % (Tab. 22).

Tab. 22: Übersicht über eine mögliche Verteilung der richtigen und falschen Voraussagen der SVM der Messungen im Positiv-ESI-Modus

Diagnose	Voraussage		
	Stark eingestuft	Mittel eingestuft	Schwach eingestuft
Stark eingestuft	5	4	7
Mittel eingestuft	2	14	5
Schwach eingestuft	4	0	22

7. DISKUSSION

7.1. Histologie und Gruppeneinteilung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere konsequent nach der histologischen Diagnose in Gruppen eingeteilt. Klinische Symptome sowie weitere Diagnosen wurden nicht einbezogen. Das bedeutet, dass obwohl 78.6 % der Tiere ohne FLS und 63.3 % der Tiere mit FLS zusätzliche Diagnosen hatten, diese bei der Gruppeneinteilung nicht berücksichtigt wurden. Dass 78.6 % der Kühe ohne FLS zusätzliche Diagnosen hatten, hing damit zusammen, dass alle Tiere aus dem Patientengut des Departements für Nutztiere des Tierspitals Zürich stammten und dort behandelt wurden. KALAITZAKIS et al. (2007) stellten in ihrer Studie fest, dass die klinischen Symptome nicht immer mit dem histologischen Grad der Leberverfettung ihrer Gruppen korrelieren, daher wurden die Gruppen in der vorliegenden Studie streng nach dem histologischen Grad eingeteilt.

Wie bereits erwähnt, wiesen Tiere der Kontrollgruppe zusätzlich zum FLS weitere diverse Diagnosen auf, die nicht in die Gruppeneinteilung einbezogen wurden. Dies ist auch ein Problem anderer Studien (GRUM et al., 1996; RUKKWAMSUK et al., 1998), die sich mit dem FLS befassen. Der Grund dafür ist, dass Hochleistungskühe im Puerperium häufig an mehreren Erkrankungen leiden, die sich gegenseitig begünstigen können (CURTIS et al., 1985). Bei 63.3 % (31 Tiere) der Kühe mit FLS wurden zusätzliche Diagnosen gestellt, von diesen hatten wiederum 45.2 % (14 Tiere) zwei oder mehr zusätzliche Diagnosen. Dies bedeutet also, dass bei Kühen mit FLS die Wahrscheinlichkeit gross ist, weitere Erkrankungen zu haben. Die Auswirkung dieser Diagnosen auf das Lipidom konnte nicht abgeschätzt werden. Es konnte ausserdem nicht klar festgestellt werden, ob die Veränderungen im Lipidom vom FLS, von puerperalen Erkrankungen oder von unterschiedlichen Energiebilanzen stammten. Weiter war nicht bekannt, ob das FLS weiteren Erkrankungen vorausging oder umgekehrt. Es ist jedoch gut möglich, dass durch die Immunsuppression, die durch das FLS entstanden sein kann, weitere Erkrankungen begünstigt wurden (REID et al., 1984;

WENSING et al., 1997; RUKKWAMSUK et al., 1999a; ZERBE et al., 2000). BOBE et al. (2004) führten in ihrer Übersicht über das FLS verschiedene Assoziationen des FLS mit anderen Krankheiten auf, welche in verschiedenen Studien gefunden wurden.

NORDSTRÖM und LEWENSOHN (2010) betonten, dass Faktoren wie Fütterung, Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Probenentnahme, Probenart, Gruppengrösse und -heterogenität bei der Planung einer Metabolomik-Studie berücksichtigt werden sollten. Diese und weitere Faktoren wie Gruppengrösse, Herkunft, Rasse, Verlauf der Geburt, Haltung, und Begleiterkrankungen waren in dieser Studie sehr unterschiedlich und teilweise unbekannt. Da die Tiere aus dem Patientengut des Tierspitals Zürich stammten und es sich um eine retrospektive Studie handelte, konnte kein Einfluss auf diese Faktoren genommen werden. Deswegen waren die Gruppen sehr inhomogen. Dies ist für eine Untersuchung des Metaboloms und für statistische Analysen problematisch. Zudem konnten die Einflüsse dieser zusätzlichen Faktoren nicht interpretiert werden. Um diese Einflüsse zu reduzieren, wurden für die Untersuchung des Lipidoms nur milchbetonte Rassen (FV und HF) verwendet, welche auch am häufigsten vertreten waren.

Die Plasmaproben stammten von Tieren aus dem Patientengut des Departements für Nutztiere der Universität Zürich aus den Jahren 2001 - 2011. In einer Studie von MATTHAN et al. (2010) wurde gezeigt, dass sich die Cholesterylester-, Triglycerid- und Phospholipidfraktionen im Fettsäureprofil von Plasmaproben, welche 8 - 10 Jahre bei -80 °C gelagert wurden, nicht signifikant veränderten und mit dieser Methode gut konserviert wurden. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Lipide in den Plasmaproben durch die lange Gefrier- und Lagerzeit nicht beeinträchtigt wurden. Verschiedene Faktoren der Probenentnahme, wie Zeit der Entnahme, Art des Antikoagulans, Temperatur bei der Verarbeitung, Material der Blutentnahme-/Aufbewahrungsröhrchen, Anzahl Gefrierzyklen sowie die Fütterung sollten bei einer Metabolomik-Studie beachtet werden, sonst könnten diese Faktoren einen negativen Einfluss auf das Ergebnis haben

(SCALBERT et al., 2009). Auf die meisten dieser Faktoren konnte kein Einfluss genommen werden. Die Anzahl Gefrierzyklen wurde minimal gehalten, jedoch war nicht bekannt, ob diese Plasmaproben bereits vor dieser Studie für andere Untersuchungen verwendet wurden und bereits einmal aufgetaut wurden.

7.2. Extraktionsmethoden

Bei der Evaluation einer geeigneten Extraktionsmethode für die Untersuchung des Lipidoms beim Rind waren die allgemeinen Messintensitäten, die Intensitäten der internen Standards (IS) im Positiv- und Negativ-ESI-Modus sowie die Messgenauigkeiten bei allen drei Extraktionsmethoden vergleichbar. Bei den Extraktionen nach BLIGH und DYER (1959) und nach FOLCH (1957) war es nicht möglich, die lipidhaltige Phase so zu gewinnen, dass keine unlösliche Matrix in den Extrakt gelangte. Ein Nachteil unlösbarer Matrix im Extrakt lag darin, dass das LC-MS System (v. a. die Säule, die Kapillaren oder der Elektronenspray der Ionenquelle) verstopfte und das Chromatogramm des Lipidoms durch lipidfremde Stoffe verfälscht werden konnte (MATYASH et al., 2008). Zudem ergab die Studie von MATYASH et al. (2008), dass mit der Extraktion mit MTBE eine gleichgute oder sogar bessere Gewinnung von Lipiden erreicht wurde wie mit der Extraktion nach FOLCH (1957). Zudem konnte der Extrakt einfach, ohne Tropfverlust und ohne makroskopische Kontamination mit unlöslicher Matrix gewonnen werden, da die lipidhaltige Phase zuoberst war. Zudem musste beachtet werden, dass das bei der Extraktion nach BLIGH und DYER (1959) und nach FOLCH (1957) verwendete Chloroform karzinogen wirkt (NAGANO et al., 2006) und dass beim Abbau von Chloroform Phosgene und Salzsäure entstehen könnten, welche labile Lipidspezies chemisch modifizieren können (MATYASH et al., 2008).

Die Wahl der Extraktionsmethode fiel daher aufgrund der Gewinnung der lipidhaltigen Phase, der Qualität der Extraktion sowie aus gesundheitlichen und Stabilitätsgründen auf die Extraktion mit MTBE nach MATYASH et al. (2008).

7.3. Auswertung des Vergleichs des Lipidoms von HF- und FV-Kühen

Obwohl es zwischen den Rassen HF und FV Unterschiede im Lipidom gab, waren diese jedoch gering. Der Hauptunterschied lag darin, dass verschiedene Massen zwischen den Schweregraden der Rassen signifikant unterschiedliche Intensitäten zeigten. So konnte eine Masse in der einen Rasse zwischen den Schweregraden signifikante Unterschiede zeigen, während sie bei der anderen Rasse keine Signifikanz bewirkte. Daher wurden später auch nur Massen für die Berechnung des Klassifikators mittels SVM verwendet, die bei beiden Rassen signifikante Unterschiede zeigten.

7.4. Auswertung des Lipidomvergleichs

7.4.1. Auswertung des Vergleichs aller Gruppen und der Kühe mit und ohne FLS

Es gab Unterschiede zwischen den Schweregraden sowie zwischen Kühen mit und ohne FLS, diese waren jedoch klein. Vor allem die Massen der Messungen im Positiv-ESI-Modus waren für die Unterschiede verantwortlich. Dies zeigte sich zum einen darin, dass sich die Gruppen (Schweregrade oder Kühe mit und ohne FLS) vor allem in den Messungen im Positiv-ESI-Modus signifikant unterschieden (2-Weg-ANOVA und BGA) und zum anderen darin, dass die Mehrheit der kontinuierlich vorkommenden Massen aus den Messungen im Positiv-ESI-Modus stammten. Innerhalb der Rassen zeigten die HF-Kühe am meisten Unterschiede.

Die einzelnen 1-Weg-ANOVA-Analysen förderten viele verschiedene potentielle Marker zu Tage. Jedoch wiesen nur wenige davon bei allen Vergleichen signifikante Unterschiede auf (Schweregrade oder Kühe mit und ohne FLS, beider Kuhrasen sowie innerhalb der einzelnen Rassen). Diese Massen waren zwischen den Schweregraden sehr unterschiedlich verteilt und zeigten keine Tendenz, von Schweregrad 0 zu Schweregrad 4 kontinuierlich zu steigen oder zu sinken. Zudem waren die Massen nicht zwischen allen Gruppen signifikant unterschiedlich. So

war z. B. die Masse m/z 288.28880, ein $(M+H)^+$ Ion, zwischen den Gruppen 0 und 1 signifikant unterschiedlich aber nicht zwischen den Gruppen 0 und 4. Dies erlaubte keine Unterscheidung der Schweregrade anhand eines Grenzwerts, der besagt, dass Tiere mit einem Wert über oder unter dieser Grenze zu einer gewissen Gruppe gehören. Die Ursache für diese Inkontinuität war unbekannt. Hypothesen waren, dass sich die Lipidzusammenstellung im Plasma in Abhängigkeit des Schweregrades einer Leberverfettung ändert. Dies kann Folge der pathologischen Leberveränderungen oder Teil der Pathogenese sein. Eine weitere Hypothese war, dass zu viele Gruppen gebildet wurden und für eine Erstuntersuchung des Lipidoms zu kleine Unterschiede bestanden. Daher wurden in einem weiteren Schritt die Gruppen 0 und 1 sowie die Gruppen 3 und 4 zu den Gruppen der schwach (Grad 0 und 1), mittel (Grad 2) und stark (Grad 3 und 4) betroffenen Kühe zusammengelegt. Diese Einteilung lehnt an die Einteilung von BOBE et al. (2004) an; diese Autoren verwendeten die Gruppen gesund, leichtes, mittleres und schweres FLS.

Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen histologisch kein FLS auf, bei ihnen wurden jedoch andere Diagnosen wie Labmagenverlagerung nach links oder rechts, Sohlengeschwür, Endometritis, Bronchopneumonie, etc. gestellt. Es ist unbekannt, ob diese Erkrankungen das Lipidom veränderten und damit spezifische Veränderungen des FLS überdeckten und die Unterschiede ebenfalls beeinflussten. Weiter könnte auch sein, dass die Veränderungen allgemein durch eine veränderte Energiebilanz hervorgerufen wurden, die bei allen Kühen durch diese Begleiterkrankungen entstand. Weiter sollte bedacht werden, dass die gezeigten Veränderungen und Unterschiede im Lipidom auch allgemein je nach Schweregrad einer allgemeinen Erkrankung vorkommen könnten und hier nur zufällig mit dem Grad des FLS korrelieren. Dies könnte überprüft werden, indem die klinischen Symptome in die Auswertung miteinbezogen würden. Dabei müsste beachtet werden, dass Begleiterkrankungen die Symptomatik beeinflussen könnten.

7.4.2. Auswertung des Vergleichs der Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühen

Insgesamt entsprachen die Ergebnisse dieser Analyse derjenigen mit den detaillierteren Schweregraden. Jedoch waren die Unterschiede in der BGA etwas deutlicher. Der grösste Unterschied lag in der Verteilung der signifikant unterschiedlichen Massen zwischen den Gruppen. In der Untersuchung der Gruppen schwach, mittel und stark zeigten die Intensitäten der Massen tendenziell eine Zunahme oder Abnahme von der Gruppe der schwach zur Gruppe der stark betroffenen Kühe.

Hier wurden in der Kontrollgruppe nicht nur Tiere ohne FLS berücksichtigt (Grad 0) sondern auch solche mit einem leichtgradigem (Grad 1) FLS. Da die erste Untersuchung mit sehr detaillierten Schweregraden nur geringgradige Unterschiede zeigte, wurde nun versucht die Gruppen einerseits zahlenmässig ausgeglichener zu gestalten und andererseits die angenommenen Unterschiede zwischen den Gruppen zu vergrössern. Es wurde angenommen, dass die Leber von Tieren mit Schweregrad 1 kaum beeinträchtigt war und daher im Lipidom noch keine grossen Veränderungen stattfanden im Gegensatz zum Schweregrad 2. Weiter wurde davon ausgegangen, dass sich die Leberschädigung von Schweregrad 3 und 4 nicht stark unterschiedlich auf das Lipidom auswirkten und daher zusammengelegt werden konnten. Deswegen wurden diese Gruppen zusammengenommen und eine neue Analyse durchgeführt. Mit dem Resultat, dass es nur noch eine Masse gab (m/z 468.43458, ein $[M+NH_4]^+$ Ion), die kontinuierlich vorkam. Diese Masse kam auch bei der Auswertung des Vergleichs aller Schweregrade vor. Bei den Gruppen der schwach, mittel und stark betroffenen Kühen verteilte sich diese Masse zwischen den Gruppen aber so, dass die Intensitäten von schwach zu stark betroffenen Tieren abnahmen. Aus dieser Masse könnte evtl. ein Marker entstehen, der (zusammen mit anderen Markern) zwischen den schwach und den stark betroffenen Tieren unterscheiden könnte. Dies wird Grundlage für weitere Untersuchungen sein.

7.4.3. Auswertung des Lipidoms mit der Support Vector Machine (SVM)

Tiere mit und ohne FLS

Für die Berechnung des Klassifikators mittels SVM wurden, um Marker zu finden, die nicht nur für eine Rasse aussagekräftig waren, nur die Daten der Massen verwendet, die bei beiden Rassen als signifikant galten. Der Klassifikator wurde nur für die Unterscheidung von Tieren mit und ohne FLS berechnet.

Die Gruppen waren unterschiedlich gross; deshalb waren die Fehlerraten niedrig, obwohl kaum Tiere ohne FLS richtig (Spezifität der Messungen waren 0 % bzw. 14.3 % im Positiv- bzw. im Negativ-ESI-Modus) vorausgesagt wurden. Ein weiteres Problem waren die stark variierenden Richtigkeiten. Sie reichten in der SVM der Messungen im Positiv-ESI-Modus von 42.9 bis 100 % und in der SVM der Messungen im Negativ-ESI-Modus von 50 bis 100 %. Die Ursache dafür waren die verschiedenen Trainingssets, die der SVM in einem Rechendurchlauf verwendete. Daher könnten auch die Fehlerraten unterschiedlich sein. Trotz dieser Probleme konnte davon ausgegangen werden, dass die berechneten Klassifikatoren einen gewissen prädiktiven Wert haben.

Tiere mit schwach, mittel und stark eingestuftem FLS

Auch bei dieser Auswertung bestanden ähnliche Probleme wie bei der Berechnung des Klassifikators mittels SVM für Tiere mit und ohne FLS. Auch hier variierten die Richtigkeiten stark (von 0 % bis 100 %). Die Sensitivität und Spezifität waren bei dieser Auswertung ausgeglichener. Die Sensitivität der mittel und stark eingestuften Tiere zusammen (67.6 %) war ähnlich wie die Sensitivität der mittel eingestuften Tiere (66.7 %), so dass nur je ca. ein Drittel der Tiere als krank angesprochen wurden, obwohl sie nur schwach betroffen waren. Die Sensitivität der stark eingestuften Tiere war niedrig (31.3 %), so dass ein grosser Teil der schwach eingestuften Tiere als stark eingestuft angesprochen wurden. Die Spezifität betrug 84.6 %, so dass ein Grossteil der schwach eingestuften Tiere auch als schwach betroffen angesehen wurde.

7.5. Mögliche Identifikation der sich signifikant unterscheidenden Massen

Die chemische Identifikation der Massen war zum Zeitpunkt der Dissertation nicht möglich, was ein Nachteil der ungezielten Metabolomik-Methoden ist (GRIFFITHS et al., 2010). Ein gezielter Metabolomik-Ansatz ist ohne Vorkenntnisse des Metaboloms jedoch nicht möglich. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die genaue Struktur der Moleküle abzuklären. Bei Fettsäuren bedeutet dies z. B., dass die Lokalisation von Doppelbindungen oder die Anzahl und Länge der C-Ketten festgestellt werden müssten. Dies kann unter anderem anhand einer MS/MS-Studie erreicht werden, in der die vermuteten Stoffe gemessen und verglichen werden.

Für alle Massen wurde angenommen, dass es sich um protonierte $(M+H)^+$ oder deprotonierte $(M-H)^-$ Ionen handelte. Die Massen m/z 468.43458 und m/z 686.58743 bildeten die Ausnahmen. Für diese beiden Massen konnte für das $(M+H)^+$ Ion keine Stoffe gefunden werden, sondern nur für das $(M+NH_4)^+$ Ion.

Bei der Ionisation mit ESI werden die Ionen am häufigsten durch Protonierung/Deprotonierung oder durch die Anlagerung von Ammonium (NH_4^+) oder Lithium-Ionen (Li^+) gebildet (MURPHY et al., 2005). Das NH_4^+ stammte bei dieser Studie vom Acetonitril und/oder vom Ammoniumazetat aus dem Gradientensystem des UPLC. Die Konzentration von Li^+ wurde als zu gering erachtet, als dass es in nennenswerter Weise an der Ionisation hätte beteiligt sein können. Weiter werden bei der Ionisation mit ESI aus kleinen Molekülen (bis ein paar hundert Dalton) einfach geladene Ionen gebildet (KEBARLE und TANG, 1993).

Die Stoffe konnten weiter stark eingegrenzt werden, da das Massenspektrometer Synapt G2 HDMS (Waters, Milford, MA, USA) mit einer sehr hohen Massengenauigkeit gemessen hat.

Bei den Massen der Messungen im Negativ-ESI-Modus handelte es sich wahrscheinlich um Steroide und Glycerophosphocholin. Mögliche Stoffgruppen der Messungen im Positiv-ESI-Modus waren Sphingoide, Flavanoide, Eicosanoide, Cholesterolderivate, Glycerophosphoglycerole, Vitamin D3-Derivate, Sulfate, FS

sowie Diacylglycerophosphocholine. Pflanzenstoffe wie Flavanoide konnten nicht ausgeschlossen werden, da diese über das Futter aufgenommen werden könnten. Mit grosser Wahrscheinlichkeit konnten jedoch z. B. deuterierte oder halogenisierte Stoffe etc. ausgeschlossen werden, da diese nicht natürlich vorkommen.

7.6. Schlussfolgerung

In dieser Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass Unterschiede im Lipidom von Tieren mit und ohne FLS und von Tieren mit verschiedenen Schweregraden vorhanden, aber nur gering ausgeprägt waren. In zukünftigen Studien sollten in den Kontrollgruppen Tiere verwendet werden, die weder ein FLS noch andere Erkrankungen haben. Dies könnten z. B. Milchkühe in fortgeschrittener Laktation oder Rinder sein. In diesem Fall sind dann die Tiere nicht mehr alle im gleichen Laktationsstadium, wie es in dieser Studie geplant war (0 bis 8 Wochen postpartum). Das Problem bei Tieren im Puerperium ist, dass sie meistens typische puerperale Erkrankungen wie Mastitis, Labmagenverlagerung, Klauenprobleme oder Endometritis aufweisen. Ob oder in welcher Weise diese Erkrankungen das Lipidom beeinflussen, ist nicht bekannt.

Weiter wäre es sinnvoll, die Veränderungen des Lipidoms während der gesamten peripartalen Übergangsphase zu verfolgen und den Verlauf von Kühen, die ein FLS entwickeln, mit jenem von Kühen ohne FLS zu vergleichen. Der Vorteil eines Vergleichs des Lipidoms im Verlauf des Puerperiums derselben Kuh wäre der Ausschluss von störenden Faktoren wie Rasse, Haltung, Fütterung, Begleiterkrankungen etc.

Zu beachten ist, dass nicht klar war, ob das Fett beim FLS in der Leber homogen verteilt war und dies mit einer einzelnen Biopsie nachgewiesen werden konnte (HERDT und GERLOFF, 2008). Beim Menschen repräsentiert eine Biopsie nur 1/50'000tel der Leber (BRAVO et al., 2001). Zudem wurden bereits fokale Leberverfettungen bei Rindern festgestellt, ob diese fokalen Verfettungen jedoch klinisch relevant sind, ist unklar (CLAIN et al., 1984; MOHAMED et al., 2004).

Diese Dissertation war ein Teil einer grösseren Studie, deren Ziel ist es, mögliche Biomarker für die Diagnostik des FLS zu identifizieren und zu validieren, um einen brauchbaren nicht-invasiven Bluttest entwickeln zu können. In dieser Studie wurden retrospektiv Proben ausgewählt, um die Methoden zur Untersuchung des Lipidoms beim Rind zu etablieren. Ausserdem wurden anhand dieser Untersuchungen passende statistische Modelle getestet. Die erarbeiteten Methoden werden Grundlage für weitere Studien sein. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede und somit auch potentielle Biomarker für die Diagnostik gibt. Ein nächster Schritt wird die Validierung dieser Marker sein. Hierzu werden Blutproben neuer Tiere in gleicher Weise mit Fokus auf die bereits erkannten Kandidaten untersucht.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ACORDA, J. A., H. YAMADA and S. M. GHAMSARI (1995): Comparative evaluation of fatty infiltration of the liver in dairy cattle by using blood and serum analysis, ultrasonography, and digital analysis. *Vet. Quart.* 17, 12-14.

ADEWUYI, A. A., E. GRUYS and F. J. VAN EERDENBURG (2005): Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet. Quart.* 27, 117-126.

ASTARITA, G., F. AHMED and D. PIOMELLI (2009): Lipidomic analysis of biological samples by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Method. Mol. Biol.* 579, 201-219.

ATKINSON, T., V. R. FOWLER, G. A. GARTON and A. K. LOUGH (1972): A rapid method for the accurate determination of lipid in animal tissues. *Analyst* 97, 562-568.

BATEMAN, H. G. and T. C. JENKINS (1997): Method for extraction and separation by solid phase extraction of neutral lipid, free fatty acids, and polar lipid from mixed microbial cultures. *J. Agr. Food Chem.* 45, 132-134.

BELL, A. W. (1995): Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73, 2804-2819.

BERNABUCCI, U., B. RONCHI, L. BASIRICO, D. PIRAZZI, F. RUECA, N. LACETERA and A. NARDONE (2004): Abundance of mRNA of apolipoprotein b100, apolipoprotein e, and microsomal triglyceride transfer protein in liver from periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 2881-8.

BERTICS, S. J., R. R. GRUMMER, C. CADORNIGA-VALINO and E. E. STODDARD (1992): Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *J. Dairy Sci.* 75, 1914-1922.

BLIGH, E. G. and W. J. DYER (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

BOBE, G., V. R. AMIN, A. R. HIPPEN, P. SHE, J. W. YOUNG and D. C. BEITZ (2008): Non-invasive detection of fatty liver in dairy cows by digital analyses of hepatic ultrasonograms. *J. Dairy Res.* 75, 84-89.

BOBE, G., J. W. YOUNG and D. C. BEITZ (2004): Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3105-3124.

BRAUN, U. (2009): Ultrasonography of the liver in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 25, 591-609.

BRAVO, A. A., S. G. SHETH and S. CHOPRA (2001): Liver biopsy. *New Engl. J. Med.* 344, 495-500.

BROCKMAN, R. P., E. N. BERGMAN, P. K. JOO and J. G. MANNS (1975): Effects of glucagon and insulin on net hepatic metabolism of glucose precursors in sheep. *Am. J. Physiol.* 229, 1344-1350.

BROWN, M. S., P. T. KOVANEN and J. L. GOLDSTEIN (1981): Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 212, 628-635.

BRUMBY, P. E., M. ANDERSON, B. TUCKLEY, J. E. STORRY and K. G. HIBBIT (1975): Lipid metabolism in the cow during starvation-induced ketosis. *Biochem. J.* 146, 609-615.

BUDZIKIEWICZ, H. and M. SCHÄFER (2004): Massenspektrometrie: eine Einführung, 5. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 232.

CASTRO-PEREZ, J. M., J. KAMPHORST, J. DEGROOT, F. LAFEBER, J. GOSHAWK, K. YU, J. P. SHOCKCOR, R. J. VREEKEN and T. HANKEMEIER (2010): Comprehensive LC-MSE lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients. *J. Proteome Res.* 9, 2377-2389.

CEBRA, C. K., F. B. GARRY, D. M. GETZY and M. J. FETTMAN (1997): Hepatic lipidosis in anorectic, lactating Holstein cattle: a retrospective study of serum biochemical abnormalities. *J. Vet. Intern. Med.* 11, 231-237.

CLAIN, J. E., D. H. STEPHENS and J. W. CHARBONEAU (1984): Ultrasonography and computed tomography in focal fatty liver. Report of two cases with special emphasis on changing appearances over time. *Gastroenterology* 87, 948-52.

COLLINS, R. A. and I. M. REID (1980): A correlated biochemical and stereological study of periparturient fatty liver in the dairy cow. *Res. Vet. Sci.* 28, 373-376.

COLLINS, R. A., I. M. REID, L. A. WILLIAMS and P. F. DENNIS (1985): Histological measurement of fat content of liver of dairy cows. *J. Comp. Pathol.* 95, 437-441.

CURTIS, C. R., H. N. ERB, C. J. SNIFFEN, R. D. SMITH and D. S. KRONFELD (1985): Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 68, 2347-60.

DOUGLAS, G. N., J. REHAGE, A. D. BEAULIEU, A. O. BAHAA and J. K. DRACKLEY (2007): Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 2941-2959.

DRACKLEY, J. K. (1999): ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82, 2259-2273.

DRACKLEY, J. K., T. R. OVERTON and G. N. DOUGLAS (2001): Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 84, E100-E112.

ECKERSALL, P. D. and R. BELL (2010): Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 185, 23-27.

EMERY, R. S., J. S. LIESMAN and T. H. HERDT (1992): Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J. Nutr.* 122, 832-837.

FIEHN, O. (2001): Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics* 2, 155-168.

FOLCH, J. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

GAAL, T., I. M. REID, R. A. COLLINS, C. J. ROBERTS and B. V. PIKE (1983): Comparison of biochemical and histological methods of estimating fat content of liver of dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 34, 245-248.

GARNSWORTHY, P. C. and J. H. TOPPS (1982): The effect of body condition of dairy cows at calving on their food intake and performance when given complete diets. *Anim. Sci.* 35, 113-119.

GARRY, F. B., M. J. FETTMAN, C. R. CURTIS and J. A. SMITH (1994): Serum bile acid concentrations in dairy cattle with hepatic lipidosis. *J. Vet. Intern. Med.* 8, 432-438.

GEELLEN, M. J. and T. WENSING (2006): Studies on hepatic lipidosis and coinciding health and fertility problems of high-producing dairy cows using the "Utrecht fatty liver model of dairy cows". A review. *Vet. Quart.* 28, 90-104.

GERBER, D. (1993): Sonographische Befunde an der Leber des Rindes. Dissertation, Universität Zürich.

GERLOFF, B. J. and T. H. HERDT (1984): Hepatic lipidosis from dietary restriction in nonlactating cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 223-224.

GERLOFF, B. J. and T. H. HERDT (1999): Fatty liver in dairy cattle. In: *Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice*, Eds. A. N. Howard, R. A. Smith. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 230-233.

GERLOFF, B. J., T. H. HERDT and R. S. EMERY (1986): Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188, 845-850.

GOFF, J. P. and R. L. HORST (1997): Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260-1268.

GRIFFITHS, W. J., T. KOAL, Y. WANG, M. KOHL, D. P. ENOT und H.-P. DEIGNER (2010): "Targeted Metabolomics" in der Biomarkerforschung. *Angew. Chem. Ger. Edit.* 122, 5554-5575.

GRUFFAT, D., D. DURAND, Y. CHILLIARD, P. WILLIAMS and D. BAUCHART (1997): Hepatic gene expression of apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80, 657-666.

GRUFFAT, D., D. DURAND, B. GRAULET and D. BAUCHART (1996): Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 375-389.

GRUM, D. E., J. K. DRACKLEY and J. H. CLARK (2002): Fatty acid metabolism in liver of dairy cows fed supplemental fat and nicotinic acid during an entire lactation. *J. Dairy Sci.* 85, 3026-3034.

GRUM, D. E., J. K. DRACKLEY, R. S. YOUNKER, D. W. LACOUNT and J. J. VEENHUIZEN (1996): Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79, 1850-1864.

GRUMMER, R. R. (1993): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3882-3896.

GUZELBEKTES, H., I. SEN, M. OK, P. D. CONSTABLE, M. BOYDAK and A. COSKUN (2010): Serum amyloid A and haptoglobin concentrations and liver fat percentage in lactating dairy cows with abomasal displacement. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 213-219.

HAMMON, H. M., G. STURMER, F. SCHNEIDER, A. TUCHSCHERER, H. BLUM, T. ENGELHARD, A. GENZEL, R. STAUFENBIEL and W. KANITZ (2009): Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. *J. Dairy Sci.* 92, 1554-1566.

HARA, A. and N. S. RADIN (1978): Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90, 420-426.

HAUDUM, A., A. STARKE, M. BEYERBACH, P. WOHLSEIN and J. REHAGE (2011): Ultrasonographic assessment of liver dimensions in dairy cows with different hepatic triacylglycerol content. *J. Anim. Sci.* 89, 1392-400.

HÄUSSINGER, D. (1990): Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem. J.* 267, 281-290.

HERDT, T. H., L. GOEDERS, J. S. LIESMAN and R. S. EMERY (1983a): Test for estimation of bovine hepatic lipid content. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 953-955.

HERDT, T. H., J. S. LIESMAN, B. J. GERLOFF and R. S. EMERY (1983b): Reduction of serum triacylglycerol-rich lipoprotein concentrations in cows with hepatic lipidosis. *Am. J. Vet. Res.* 44, 293-296.

HERDT, T. H. (2000): Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 215-230.

HERDT, T. H. and B. J. GERLOFF (2008): Fatty liver in dairy cattle. In: *Current Veterinary Therapy 5: Food Animal Practice*, Eds. D. E. Anderson, D. M. Rings. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 146-149.

JOHANNSEN, U., S. MENGER, R. STAUFENBIEL und H. KLUKAS (1993): Untersuchung zur Morphologie und Funktion der Leber von Hochleistungskühen 2 Wochen post partum. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 100, 177-181.

JORRITSMA, R., H. JORRITSMA, Y. H. SCHUKKEN, P. C. BARTLETT, T. WENSING and G. H. WENTINK (2001): Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in The Netherlands. *Livest. Prod. Sci.* 68, 53-60.

JORRITSMA, R., T. WENSING, T. A. KRUIP, P. L. VOS and J. P. NOORDHUIZEN (2003): Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* 34, 11-26.

KALAITZAKIS, E., N. ROUBIES, N. PANOUSIS, K. POURLIOTIS, E. KALDRYMIDOU and H. KARATZIAS (2006): Evaluation of ornithine carbamoyl transferase and other serum and liver-derived analytes in diagnosis of fatty liver and postsurgical outcome of left-displaced abomasum in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 1463-1471.

KALAITZAKIS, E., N. ROUBIES, N. PANOUSIS, K. POURLIOTIS, E. KALDRYMIDOU and H. KARATZIAS (2007): Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 835-845.

KALAITZAKIS, E., N. PANOUSIS, N. ROUBIES, N. GIADINIS, E. KALDRYMIDOU, M. GEORGIADIS and H. KARATZIAS (2010): Clinicopathological evaluation of downer dairy cows with fatty liver. *Can. Vet. J.* 51, 615-622.

KALTENBÖCK, K. (2010): *Chromatographie für Dummies*, 1. Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 384.

KATOH, N. (2002): Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 293-307.

KATOH, N. and H. NAKAGAWA-UETA (2001): Concentrations of apolipoprotein C-III in healthy cows during the peripartum period and cows with milk fever. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 597-601.

KEBARLE, P. and L. TANG (1993): From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 65, 972A-986A.

KUHLA, B., D. ALBRECHT, S. KUHLA and C. C. METGES (2009): Proteome analysis of fatty liver in feed-deprived dairy cows reveals interaction of fuel sensing, calcium, fatty acid, and glycogen metabolism. *Physiol. Genomics* 37, 88-98.

MARCOS, E., A. MAZUR, P. CARDOT and Y. RAYSSIGUIER (1990): Serum apolipoproteins B and A-I and naturally occurring fatty liver in dairy cows. *Lipids* 25, 575-577.

MATTHAN, N. R., B. IP, N. RESTEGHINI, L. M. AUSMAN and A. H. LICHTENSTEIN (2010): Long-term fatty acid stability in human serum cholesteryl ester, triglyceride, and phospholipid fractions. *J. Lipid Res.* 51, 2826-2832.

MATYASH, V., G. LIEBISCH, T. V. KURZCHALIA, A. SHEVCHENKO and D. SCHWUDKE (2008): Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* 49, 1137-1146.

MAXIE, M. and K. JUBB (2007): Hepatic lipidosis. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5th Edn, E. M. G. Maxie. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 310-315.

MOHAMED, T., S. OIKAWA, T. KUROSAWA, K. TAKEHANA, Y. HOSAKA, H. OKADA, M. KOIWA and H. SATO (2004): Focal fatty liver in a heifer: utility of ultrasonography in diagnosis. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 341-344.

MORROW, D. A. (1976): Fat cow syndrome. *J. Dairy Sci.* 59, 1625-1629.

MULLIGAN, F. J. and M. L. DOHERTY (2008): Production diseases of the transition cow. *Vet. J.* 176, 3-9.

MURPHY, R., R. M. BARKLEY and J. KRANK (2005): LC/MS methodology in lipid analysis and structural characterization of novel lipid species In: Functional Lipidomics, Eds. L. Feng, G. D. Prestwich. Taylor & Francis Group, CRC Press, London, 17-56.

NAGANO, K., H. KANO, H. ARITO, S. YAMAMOTO and T. MATSUSHIMA (2006): Enhancement of renal carcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to chloroform in male rats. *J. Toxicol. Env. Health. A* 69, 1827-1842.

NAKAGAWA, H., S. OIKAWA, T. OOHASHI and N. KATOH (1997): Decreased serum lecithin:cholesterol acyltransferase activity in spontaneous cases of fatty liver in cows. *Vet. Res. Commun.* 21, 1-8.

NAKAGAWA, H., O. YAMAMOTO, S. OIKAWA, H. HIGUCHI, A. WATANABE and N. KATOH (1997): Detection of serum haptoglobin by

enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver. *Res. Vet. Sci.* 62, 137-141.

NORDSTRÖM, A. and R. LEWENSOHN (2010): Metabolomics: moving to the clinic. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5, 4-17.

OIKAWA, S., Y. MIZUNUMA, Y. IWASAKI and M. THARWAT (2010): Changes of very low-density lipoprotein concentration in hepatic blood from cows with fasting-induced hepatic lipidosis. *Can. J. Vet. Res.* 74, 317-20.

OTTO, M. (2006): Massenspektrometrie - die Bruchstücke eines Moleküls werden identifiziert. In: *Analytische Chemie*, 3. Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim 324-345.

OVERTON, T. R., J. K. DRACKLEY, C. J. OTTEMANN-ABBAMONTE, A. D. BEAULIEU, L. S. EMMERT and J. H. CLARK (1999): Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. *J. Anim. Sci.* 77, 1940-1951.

PETTERSON, J. A., F. R. DUNSHEA, R. A. EHRHARDT and A. W. BELL (1993): Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J. Nutr.* 123, 1286-1295.

PLUSKAL, T., S. CASTILLO, A. VILLAR-BRIONES and M. ORESIC (2010): MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395-406.

PULLEN, D. L., J. S. LIESMAN and R. S. EMERY (1990): A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. *J. Anim. Sci.* 68, 1395-1399.

RADOSTITS, O., C. GAY, K. HINCHCLIFF and P. D. CONSTABLE (2006): Fatty liver in cattle (fat cow syndrome, pregnancy toxemia in cattle). In: *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 10th Edn, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1671-1678.

REHAGE, J., K. QUALMANN, C. MEIER, N. STOCKHOFE-ZURWIEDEN, M. HOELTERSHINKEN und J. POHLENZ (1999): Serum-Gesamtgallensäurenkonzentration von Kühen mit einfacher Leberverfettung oder Leberinsuffizienz. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 106, 26-29.

REID, I. M. (1980): Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *Vet. Rec.* 107, 281-4.

REID, I. M., A. M. DEW and L. A. WILLIAMS (1984): Haematology of subclinical fatty liver in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 37, 63-65.

RUKKWAMSUK, T., T. WENSING and M. J. GEELLEN (1998): Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 81, 2904-2911.

RUKKWAMSUK, T., T. A. KRUIP and T. WENSING (1999a): Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Quart.* 21, 71-77.

RUKKWAMSUK, T., T. WENSING and M. J. GEELLEN (1999b): Effect of fatty liver on hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 500-505.

RUKKWAMSUK, T., T. WENSING and M. J. GEELLEN (1999c): Effect of overfeeding during the dry period on the rate of esterification in adipose tissue of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 82, 1164-1169.

RUKKWAMSUK, T., T. WENSING and T. A. KRUIP (1999d): Relationship between triacylglycerol concentration in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 51, 1133-1142.

RUKKWAMSUK, T., M. J. GEELLEN, T. A. KRUIP and T. WENSING (2000): Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *J. Dairy Sci.* 83, 52-59.

SATO, H., T. MOHAMED, A. GOTO, S. OIKAWA and T. KUROSAWA (2004): Fatty acid profiles in relation to triglyceride level in the liver of dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 85-87.

SCALBERT, A., L. BRENNAN, O. FIEHN, T. HANKEMEIER, B. S. KRISTAL, B. VAN OMMEN, E. PUJOS-GUILLOT, E. VERHEIJ, D. WISHART and S. WOPEREIS (2009): Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* 5, 435-458.

SCHMELZER, K., E. FAHY, S. SUBRAMANIAM and E. A. DENNIS (2007): The lipid maps initiative in lipidomics. *Method. Enzymol.* 432, 171-183.

SMITH, T. R., A. R. HIPPEN, D. C. BEITZ and J. W. YOUNG (1997): Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80, 1569-1581.

STARKE, A., A. HAUDUM, R. BUSCHE, M. BEYERBACH, S. DANICKE and J. REHAGE (2010): Technical note: Analysis of total lipid and triacylglycerol content in small liver biopsy samples in cattle. *J. Anim. Sci.* 88, 2741-2750.

STARKE, A., A. HAUDUM, G. WEIJERS, K. HERZOG, P. WOHLSEIN, M. BEYERBACH, C. L. DE KORTE, J. M. THIJSEN and J. REHAGE (2010): Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. *J. Dairy Sci.* 93, 2952-2965.

STAUFENBIEL, R., B. STAUFENBIEL, N. ROSSOW, H. KLUKAS und U. JOHANNSEN (1993): Diagnostik der Leberverfettung bei der Milchkuh. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 100, 225-230.

STRANG, B. D., S. J. BERTICS, R. R. GRUMMER and L. E. ARMENTANO (1998): Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 81, 728-739.

THARWAT, M. (2012): Ultrasonography as a diagnostic and prognostic approach in cattle and buffaloes with fatty infiltration of the liver. *Pol. J. Vet. Sci.* 15, 83-93.

TSUCHIYA, R., H. FUJISE, K. NISHIZONO, Y. ASHIDA, T. YAMADA and K. KOBAYASHI (1994): Assay of ornithine carbamoyl transferase activity: modification for application to bovine serum. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 21-26.

UCHIDA, E., N. KATOH and K. TAKAHASHI (1993a): Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. *J. Vet. Med. Sci.* 55, 893-894.

UCHIDA, E., N. KATOH and K. TAKAHASHI (1993b): Induction of serum haptoglobin by administration of ethionine to cows. *J. Vet. Med. Sci.* 55, 501-502.

VAN DEN TOP, A. M., M. J. GEELLEN, T. WENSING, G. H. WENTINK, A. T. VAN 'T KLOOSTER and A. C. BEYNEN (1996): Higher postpartum hepatic triacylglycerol concentrations in dairy cows with free rather than restricted access to feed during the dry period are associated with lower activities of hepatic glycerolphosphate acyltransferase. *J. Nutr.* 126, 76-85.

VAN DEN TOP, A. M., A. VAN TOL, H. JANSEN, M. J. GEELLEN and A. C. BEYNEN (2005): Fatty liver in dairy cows post partum is associated with

decreased concentration of plasma triacylglycerols and decreased activity of lipoprotein lipase in adipocytes. *J. Dairy Res.* 72, 129-137.

VEENHUIZEN, J. J., J. K. DRACKLEY, M. J. RICHARD, T. P. SANDERSON, L. D. MILLER and J. W. YOUNG (1991): Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J. Dairy Sci.* 74, 4238-4253.

VERNON, R. G. (2005): Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J. Dairy Res.* 72, 460-469.

WENSING, T., T. KRUIP, M. GEELLEN, G. WENTINK and A. VAN DEN TOP (1997): Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems. *Comp. Haematol. Int.* 7, 167-171.

YAMAMOTO, M., H. NAKAGAWA-UETA, N. KATOH and S. OIKAWA (2001): Decreased concentration of serum apolipoprotein C-III in cows with fatty liver, ketosis, left displacement of the abomasum, milk fever and retained placenta. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 227-231.

YUNG, M. C., M. J. VANDEHAAR, R. L. FOGWELL and B. K. SHARMA (1996): Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers. *J. Anim. Sci.* 74, 2239-2244.

ZERBE, H., N. SCHNEIDER, W. LEIBOLD, T. WENSING, T. A. KRUIP and H. J. SCHUBERTH (2000): Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 54, 771-786.

ZHU, L. H., L. E. ARMENTANO, D. R. BREMMER, R. R. GRUMMER and S. J. BERTICS (2000): Plasma concentration of urea, ammonia, glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance. *J. Dairy Sci.* 83, 734-740.

9. LEBENSLAUF

Name	Maude Gubler
Geburtsdatum	1.12.1984
Geburtsort	Lenzburg
Nationalität	Schweiz
Heimatort	Wängi/Matzingen TG
1991-1996	Primarschule Staufien
1996-2000	Bezirksschule Lenzburg
2000-2004	Alte Kantonsschule Aarau, Schwerpunkt Biologie und Chemie
2005-2010	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Schwerpunkt Nutztiermedizin
2010-2012	Doktorandin am Departement für Nutztiere der Universität Zürich
Seit Januar 2012	Assistentin in der Nutztierpraxis Rudolph, Dr. med. vet. Jörn Rudolph in Sulz LU.

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun für die Übernahme des Referats, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung, die Korrektur der Dissertation und für die Erlaubnis, alle Krankengeschichten der letzten Jahre verwenden zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. H. Nägeli für die Übernahme des Korreferats.

Insbesondere auch meinem Betreuer Dr. C. Gerspach für die Leitung und wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation, die bereits geleistete Vorarbeit und für die optimistische, fröhliche und unermüdliche Unterstützung.

Im Weiteren gehört mein Dank:

Frau Dr. M. Rütten, Institut für Veterinärpathologie, für die Durchführung der histologischen Untersuchungen und das Bereitstellen von Bildern.

Herrn Dr. E. Laczko und dem Functional Genomics Center Zürich (FGCZ) für die freundliche Hilfe mit den verschiedenen Massenspektrometern und für die Ausführung der statistischen Auswertung der Resultate.

Den Landwirten Josef Kuchler, Hans Flükiger, Thomas Weber und Rhea Baggenstos für die zur Verfügungsstellung ihrer Kühe zur Entnahme von Blut und Leberbiopsien.

Meinen Kollegen Sandro Imhasly, Malin Olson und David Fischer für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung einer Untersuchungsmethode mit dem Massenspektrometer, bei der Auswertung der Resultate und für die Unterstützung während all den Stunden im FGCZ.

Meinen Kolleginnen und Kollegen aus der Nutztiermedizin und Ambulanz und aus den anderen Abteilungen für die Unterstützung während der ganzen Zeit.

Meiner Mutter Elisabeth Wüthrich, meinem Bruder Pascal Gubler und meinem Freund Jakob Schneider für die ermunternde und aufbauende Unterstützung und für das Mittragen aller Hochs und Tiefs während der Erstellung der Dissertation.